

Analyse des  
Succinat-Dehydrogenase-Inhibitors  
Fluopyram im Nematoden  
*Caenorhabditis elegans*

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Universität zu Köln

vorgelegt von

Theresa Vogt

aus Mühlhausen (Thür.)

Copy-Star Druck und Werbung GmbH, Köln

2018

Berichtersteller:

Prof. Dr. Siegfried Roth  
PD Dr. Michael Kroiher  
Prof. Dr. Olaf Bossinger

Tag der mündlichen Prüfung:

04.07.2017





# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Fluopyram als Inhibitor der Elektronentransportkette .....	1
1.2 Bekämpfung pflanzenparasitischer Nematoden .....	2
1.3 Die mitochondriale Elektronentransportkette als Angriffspunkt neuer Nematizide .....	3
1.4 Der Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	4
1.5 Ziele der Arbeit.....	10
2 Material und Methoden .....	11
2.1 Materialien, Chemikalien und Geräte.....	11
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	13
2.2.1 Bakterienstämme .....	13
2.2.2 Medien zur Kultivierung von Bakterienstämmen .....	13
2.2.3 Isolierung und Sequenzierung genomischer DNA .....	14
2.2.4 RNA Isolierung.....	15
2.2.5 cDNA Synthese .....	16
2.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	16
2.2.7 Oligonukleotide .....	17
2.2.8 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	18
2.2.9 Ligation, T/A Klonierung.....	19
2.2.10 Transformation von Plasmid-DNA .....	19
2.2.11 Isolation von Plasmid-DNA.....	20
2.2.12 Photometrische Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von DNA..	21
2.2.13 Agarosegelelektrophorese .....	21
2.2.14 Gelextraktion von DNA.....	22

2.2.15	DNA-Sequenzierung .....	22
2.3	Bioinformatische Analyse.....	23
2.3.1	Verwendete Software.....	23
2.3.1.1	Sequenzanalysen und Bioinformatik.....	23
2.3.1.2	Bildbearbeitung .....	24
2.3.2	Statistische Auswertung .....	24
2.4	Nematodenkultivierung und Präparation .....	25
2.4.1	Haltung von <i>C. elegans</i> und anderen freilebenden Nematoden .....	25
2.4.2	Generierung von <i>C. elegans</i> -Männchen und Verpaarung.....	27
2.4.3	Gewinnung von Embryonen .....	28
2.5	RNA vermittelte Interferenz (RNAi) Experiment durch Fütterung dsRNA produzierender Bakterien .....	28
2.5.1.1	Herstellung von Agarplatten für RNAi Experimente .....	28
2.5.1.2	Herstellung einer <i>E. coli</i> Übernachtskultur .....	28
2.5.1.3	Animpfen von Fütterungs-Platten mit Übernachtskultur.....	29
2.5.1.4	RNAi durch Fütterung.....	29
2.6	Mikroskopie.....	30
2.6.1	Stereomikroskopie.....	30
2.6.2	Licht- und Fluoreszenz-Mikroskopie.....	30
2.6.2.1	Herstellung Poly-L-Lysin beschichteter Objektträger .....	31
2.6.2.2	Formaldehyd-Fixierung für die konfokale Laser-Mikroskopie ..	31
2.6.3	4-D-Video Mikroskopie.....	31
2.6.4	Elektronenmikroskopie.....	32
2.6.4.1	Transmissionselektronenmikroskopie .....	32
2.6.4.2	Rasterelektronenmikroskopie .....	33
2.7	Bestimmung des Fettgehalts durch Oil Red O Färbung .....	34
2.8	EMS Mutagenese Screen.....	35
2.9	Fluopyram-Aufnahme Assays.....	36
2.9.1	<i>E. coli</i> Nahrungsaufnahme (OD <sub>600</sub> ) Assay .....	36
2.9.2	Kälte-Assay.....	38

3	Ergebnisse.....	39
3.1	Etablierung des Fluopyram-Assays und Bestimmung der subletalen Konzentration .....	39
3.1.1	Entwicklung und Etablierung des FP-Experiments.....	39
3.1.2	Verwendung des FP-Assays zur Bestimmung der subletalen Konzentration für <i>C. elegans</i> .....	42
3.2	Kritische Fluopyram-Konzentrationen bezüglich des <i>C. elegans</i> Lebenszyklus...	45
3.2.1	Permanente FP-Behandlung von <i>C. elegans</i> Embryonen und Larven: Ermittlung der kritischen Konzentration.....	45
3.2.2	Analyse der Zellteilungsprozesse von <i>C. elegans</i> Embryonen unter FP-Behandlung .....	48
3.2.3	Permanente FP-Behandlung reduziert die Nachkommenzahl und arretiert die Entwicklung der Larvenstadien von <i>C. elegans</i> .....	50
3.2.4	FP-induzierte Phänotypen nach FP-Pulsbehandlung sind teilweise reversibel.....	53
3.2.5	FP inhibiert die Entwicklung anderer freilebender Nematoden.....	55
3.3	Aufnahmemechanismus von Fluopyram .....	58
3.3.1	Die Wirkung von FP ist unabhängig von der Nahrungsaufnahme .....	58
3.3.2	Veränderung des Fettstoffwechsels unter FP-Einfluss .....	61
3.3.3	Charakterisierung der FP-Aufnahme über die Kutikula .....	62
3.3.4	Die FP-Behandlung führt zu einer Veränderung der äußeren Morphologie von <i>C. elegans</i> .....	66
3.4	Mutationen in der <i>C. elegans</i> mitochondrialen Elektronentransportkette können zu Resistenz gegen die Fluopyram-Behandlung führen .....	67
3.5	Fluopyram beeinflusst die Morphologie und die Funktion der Mitochondrien in <i>C. elegans</i> .....	71
3.5.1	Das mitochondriale Netzwerk der Reporterstämme SJ4103 und SJ4143 verändert sich nach FP-Behandlung .....	71
3.5.2	RNAi gegen ATAD-3 und MICS-1 schließt diese Proteine als Angriffspunkte von FP aus und weist auf einen übergeordneten Angriffspunkt in der Elektronentransportkette hin .....	72
3.5.3	Auswirkungen von FP auf die Ultrastruktur der Mitochondrien im <i>C. elegans</i> WT und der <i>mev-1</i> Mutante .....	74
3.6	Putative Bindungsstelle von Fluopyram .....	77

3.6.1	In der <i>C. elegans mev-1</i> Mutante ist die Ubichinon-Bindestelle in Komplex II der Elektronentransportkette sterisch verändert .....	77
3.6.2	Phylogenetische Analyse der Komplex II-Untereinheiten SDHB, SDHC und SDHD zur Detektion potenzieller alternativer nematodenspezifischer Angriffsstellen für FP .....	78
3.7	Identifizierung Fluopyram-toleranter Mutanten durch einen EMS Mutagenese Screen.....	80
4	Diskussion .....	85
4.1	Das Fluopyram-Assay zur Untersuchung an freilebenden Nematoden.....	85
4.2	Die passive Aufnahme von Fluopyram.....	87
4.2.1	FP wird nicht nur mit den <i>E. coli</i> Bakterien aufgenommen .....	87
4.2.2	FP kann die Kutikula und die Hülle des Embryos von <i>C. elegans</i> passieren.....	88
4.3	Die kritische FP-Konzentration für den freilebenden Nematoden <i>C. elegans</i> ist abhängig vom Entwicklungsstadium .....	90
4.4	Reversibilität der Fluopyram-Wirkung .....	92
4.5	Identifikation alternativer Angriffsstellen von Fluopyram durch die Isolierung neuer Mutanten .....	93
4.6	Die Elektronentransportkette als Angriffspunkt für Fluopyram auch in Nematoden?.....	95
4.6.1	Konservierte Aminosäuren haben einen Einfluss auf die Ubichinon-Bindestelle als Angriffsort von FP .....	97
4.6.2	Modell zur Inhibition der Elektronentransportkette durch FP .....	98
4.7	Fluopyram-Behandlung an <i>C. elegans</i> als Modell für parasitäre Nematoden.....	99
5	Zusammenfassung .....	103
6	Abstract.....	105
	Literaturverzeichnis .....	107
	Abkürzungsverzeichnis .....	115
	Anhang .....	119



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1   Die mitochondriale Elektronentransportkette. ....	4
Abbildung 1-2   Der Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> .....	6
Abbildung 1-3   Anatomie eines adulten Hermaphroditen und Aufbau der Kutikula in verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i> .....	7
Abbildung 1-4   Vereinfachter Zellstammbaum von <i>C. elegans</i> . ....	8
Abbildung 2-1   Aufbau einer 48-Well Platte mit <i>E. coli</i> Nahrungsaufnahme (OD <sub>600</sub> ) Assay für <i>C. elegans</i> mit Fluopyram-Behandlung. ....	37
Abbildung 3-1   Schematische Darstellung des Fluopyram-Assays auf Agarplatten und Objektträgern bei permanenter Behandlung und Pulsexperimenten. ....	41
Abbildung 3-2   24 h Inkubation von <i>C. elegans</i> Embryonen bei verschiedenen Fluopyram-Konzentrationen auf Objektträgern und Agarplatten mit Darstellung des Phänotyps.....	43
Abbildung 3-3   Überlebensrate und Mobilität von L1-Larven bei Fluopyram-Behandlung in Flüssigkultur (M9 Medium, 48-Well Platte).....	44
Abbildung 3-4   Entwicklung von <i>C. elegans</i> Embryonen auf Objektträgern mit Agarose mit steigenden Fluopyram-Konzentrationen (0-50 ppm) in einem Zeitraum von 24 h. ....	46
Abbildung 3-5   Permanente Fluopyram-Inkubation von <i>C. elegans</i> auf Agarplatten. ....	47
Abbildung 3-6   4-D-mikroskopische Analyse der Embryogenese des <i>C. elegans</i> WT unter Fluopyram-Behandlung. ....	49
Abbildung 3-7   Anzahl der Nachkommen adulter <i>C. elegans</i> bei permanenter Fluopyram-Behandlung auf Agarplatten.....	50
Abbildung 3-8   Entwicklung von Embryonen und Lebensspanne auf Agarplatten bei permanenter Fluopyram-Behandlung. ....	52
Abbildung 3-9   Entwicklung verschiedener <i>C. elegans</i> Larvenstadien bei permanenter Fluopyram-Inkubation von 10 ppm auf Agarplatten für 48 h.....	53
Abbildung 3-10   Fluopyram-Pulsbehandlung von <i>C. elegans</i> Embryonen auf Poly-L-Lysin Objektträgern.....	54
Abbildung 3-11   Fluopyram-Pulsbehandlung von <i>C. elegans</i> L1-Larven auf Agarplatten.....	55
Abbildung 3-12   Phylogenetischer Stammbaum der Nematoden. ....	56

Abbildung 3-13   Permanente Fluopyram-Behandlung von <i>C. elegans</i> und verschiedenen freilebenden Nematoden auf Agarplatten für 5-6 Tage. ....	58
Abbildung 3-14   Fluopyram-Inkubation von kalorisch restriktiven <i>C. elegans</i> Mutanten auf Agarplatten im Vergleich zum <i>C. elegans</i> WT. ....	59
Abbildung 3-15   Darstellung der Fressrate und der Letalität (Kälte-Assay) von <i>C. elegans</i> unter Fluopyram-Einfluss. ....	60
Abbildung 3-16   Die Verteilung der Oil Red O Fettfärbung in <i>C. elegans</i> nach permanenter Fluopyram-Behandlung. ....	62
Abbildung 3-17   Darstellung der Fortbewegung und der Muskulatur des <i>C. elegans</i> WT und der <i>rol-3</i> Mutante. ....	63
Abbildung 3-18   Permanente Fluopyram-Behandlung von <i>C. elegans</i> Stämmen mit Mutationen in Genen, die für Bestandteile der Kutikula kodieren. ....	65
Abbildung 3-19   Rasterelektronenmikroskopische Aufsicht von <i>C. elegans</i> WT nach Fluopyram-Behandlung. ....	67
Abbildung 3-20   Permanente Fluopyram-Behandlung des <i>C. elegans</i> WT und verschiedenen <i>C. elegans</i> Stämmen mit Mutationen in der mitochondrialen Elektronentransportkette auf Agarplatten für 6 Tage. ....	68
Abbildung 3-21   Analyse der <i>C. elegans mev-1</i> Mutante bezüglich Nachkommen und Embryogenese unter Fluopyram-Einfluss. ....	70
Abbildung 3-22   Analyse des mitochondrialen Netzwerks der <i>C. elegans</i> Muskulatur und des Darms bei steigenden Fluopyram-Konzentrationen. ....	72
Abbildung 3-23   Analyse des mitochondrialen Netzwerks der <i>C. elegans</i> Muskulatur nach RNAi mit und ohne Fluopyram-Einfluss. ....	73
Abbildung 3-24   Elektronenmikroskopische Analyse mitochondrialer Phänotypen in der Muskulatur adulter Tiere des <i>C. elegans</i> WT und der <i>mev-1</i> Mutante mit und ohne Fluopyram-Behandlung. ....	76
Abbildung 3-25   Charakterisierung der Ubichinon-Bindungstasche der Succinat-Dehydrogenase (SDH=Succinat-Ubichinon-Oxidoreductase=Komplex II) an der Intersektion der SDHA-, SDHC- und SDHD-Untereinheiten. ....	78
Abbildung 3-26   Entwicklung und Lebensspanne neu-isolierter, Fluopyram-resistenter <i>C. elegans</i> Mutanten. ....	81
Abbildung 3-27   Paraquat-Behandlung des <i>C. elegans</i> WT, der <i>mev-1</i> Mutante und der <i>dus58</i> , <i>dus59</i> und <i>dus60</i> Allele Fluopyram-resistenter Mutanten auf Agarplatten. ....	82
Abbildung 4-1   Modell zur Inhibition von Komplex II der mitochondrialen Elektronentransportkette durch Fluopyram. ....	99

Abbildung A-1	Entwicklungsdefekte der Vulva unter permanenter Fluopyram-Behandlung. ....	119
Abbildung A-2	Lebensspanne und Nachkommenzahl verschiedener <i>C. elegans</i> Reporterstämme bei permanenter Fluopyram-Behandlung auf Agarplatten.....	119
Abbildung A-3	Elektronenmikroskopische Übersichtsdarstellung einer Muskelzelle eines adulten <i>C. elegans</i> WT nach Fluopyram-Behandlung mit 8 ppm.	120
Abbildung A-4	Nukleotid-Alignment der <i>sdhc-1</i> Sequenzen der <i>C. elegans mev-1</i> Mutante im Vergleich zum <i>C. elegans</i> WT und den neu isolierten <i>dus</i> Allelen.....	121
Abbildung A-5	Aminosäuren-Alignment der SDHC-Sequenz im hochkonservierten Bereich der Ubichinon-Bindungstasche von Nematoden und Nicht-Nematoden. ....	122
Abbildung A-6	Qualitätsauswertung der Genomsequenzierung der neu isolierten Mutanten ( <i>dus58</i> , <i>dus59</i> , <i>dus60</i> ). ....	123
Abbildung A-7	Auslese der Merkmale der sequenzierten genomischen DNA der neu isolierten Mutanten ( <i>dus58</i> , <i>dus59</i> , <i>dus60</i> ). ....	124



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1	Verwendete Reagenziensätze.....	11
Tabelle 2-2	Verwendete Geräte, Modellbezeichnung und Hersteller.....	11
Tabelle 2-3	Verwendete Bakterienstämme mit Genotyp.....	13
Tabelle 2-4	Reverse Transkription. ....	16
Tabelle 2-5	PCR Reaktions-Ansatz (KAPA2G Fast Ready Mix mit Dye).....	17
Tabelle 2-6	PCR Reaktion. ....	17
Tabelle 2-7	Oligonukleotide mit Sequenz. ....	18
Tabelle 2-8	Restriktionsverdau-Ansatz. ....	18
Tabelle 2-9	Ligations-Ansatz. ....	19
Tabelle 2-10	Plasmid Mini Präparation Puffer.....	20
Tabelle 2-11	Verwendete Volumina der Bakterien aller Versuche auf Agarplatten.....	25
Tabelle 2-12	Verwendete <i>C. elegans</i> Stämme mit Genotyp.....	26
Tabelle 2-13	Andere verwendete freilebende Nematoden. ....	27
Tabelle 2-14	Mikroskope der Firma Carl Zeiss (Jena) mit Okular, Objektiv und Kamera. ....	30
Tabelle 3-1	Verwendete Konzentrationen von Fluopyram (MW 396,7 g/mol) ausgehend von einer 50.000 ppm Stammlösung. ....	40
Tabelle 3-2	Übersicht der möglichen konservierten Angriffsstellen für Fluopyram in Nematoden und Pilzen im Vergleich zu anderen Spezies.....	79
Tabelle A-1	Identifizierte Polymorphismen in den neu isolierten <i>dus</i> Allelen. ....	125



# 1 Einleitung

Nematoden – Fadenwürmer – gehören zu den artenreichsten und am weitesten verbreiteten Stämmen des Tierreichs und zeigen eine hohe Diversität ihrer Lebensweisen. Die Schätzungen reichen von 100.000 bis 100.000.000 existierenden Arten, die in unterschiedlichsten Habitaten wie heißen Quellen, Polareis, Boden und Wasser sowie als Pflanzen-, Tier- und Insektenparasiten vorkommen (Meldal et al. 2007; Coghlan 2005). Es soll untersucht werden, inwiefern der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) als Modellorganismus geeignet ist, um Rückschlüsse auf parasitäre Nematoden zu ziehen.

## 1.1 Fluopyram als Inhibitor der Elektronentransportkette

Fluopyram (FP) ist ein Breitspektrum-Fungizid, das besonders auf pflanzenbefallende Pathogene angewendet wird (z. B. Grauschimmelfäule, echter Mehltau) (Veloukas und Karaoglanidis, 2012). FP, N-[2-[3-Chlor-5(trifluormethyl)-2-pyridinyl]ethyl]-2-(trifluormethyl) benzamid, gehört zur Klasse der Pyridylethylamiden (Ishii, Miyamoto, et al. 2011). Es bekämpft nachweislich die Verbreitung des Pilzpathogens *Fusarium virguliforme* und wird gegen *Botrytis cinera* an Tafeltrauben eingesetzt (Vitale et al. 2016). Succinat-Dehydrogenase-Inhibitoren wie FP hemmen den Komplex II der mitochondrialen Elektronentransportkette über eine Bindung an die Ubichinon Bindestelle (Ishii, Miyamoto, et al. 2011).

Wird FP auf dem Feld mit einer Konzentration von 0,5 mg/kg<sub>Erde</sub> bis 10,5 mg/kg<sub>Erde</sub> angewendet, hat es schädliche Effekte auf die mikrobiologische Ökologie. Die Kommunikation und Funktion der Mikroorganismen wird gestört (Zhang et al. 2014). Die Verwendung an Nagetieren in der Konzentration von 1.500 ppm<sup>1</sup> ist schwach krebserzeugend und führt in weiblichen Ratten zu hepatischen Karzinomen (Tinwell et al. 2014). FP ist jedoch ungefährlich gegenüber Spinnentieren wie Milben z. B. *Euseius gallicus*, ein nützlicher auf Rosengewächsen lebender Vertreter der Milben (Put et al. 2016).

Zusätzlich zu Pilzen sind pflanzenparasitische Nematoden limitierende Faktoren im landwirtschaftlichen Pflanzenanbau. Die nematizide Aktivität von FP wurde kürzlich in Studien an Pflanzenparasiten belegt (Baird et al. 2016; Faske und Hurd 2015; Burns et al. 2015).

---

<sup>1</sup> Parts per Million=mg/l

Das nur wenig toxische FP weist die gleiche Effektivität auf wie andere, auch landwirtschaftlich genutzte, hoch toxische Nematizide (Baird et al. 2016). Seine Wirksamkeit ist durch ein- bis zweimalige Anwendung gegen Befall für 200 Tage stabil (Baird et al. 2016; McClure und Schmitt, 2012). Weiterhin konnte die Wirkung von FP an den Wurzelknoten-Nematoden *Meloidogyne incognita* und *Rotylenchus reniformis* bezüglich der Infektion von Tomatenpflanzen bestätigt werden (Faske und Hurd, 2015). Die Verwendung von FP scheint wirkungsvoller im Vergleich zu anderen Komplex II Inhibitoren zur Bekämpfung von Pflanzenparasiten zu sein (Burns et al. 2015). Die FP-Formylierung 'Velum<sup>®</sup> Prime' soll mit einer Applikationsrate von 500 g/l pro ha Feld an Pflanzen angewendet werden, um den Nematoden-Befall zu bekämpfen (Broeksma et al. 2014).

## 1.2 Bekämpfung pflanzenparasitischer Nematoden

Pflanzenparasiten umfassen rund 15 % der Stämme der Nematoden. Nahezu alle Teile einer Pflanze können von einer pflanzenparasitischen Nematodenart befallen werden (Fuller et al. 2008). Die bedeutendsten Vertreter sind Wurzelknoten- und Zysten-Nematoden, die sich von ihren Wirtspflanzen zeitlebens ernähren. Die Nährstoffe, die den befallenen Pflanzen fehlen, führen folglich zu einer geringeren Fruchtproduktion.

Die Bedeutung der Bekämpfung des Pflanzenbefalls, hervorgerufen durch parasitische Nematoden, steigt zunehmend, da deren Auswirkungen immer destruktiver werden. Durch ihren Befall entstehen der Agrarwirtschaft jährlich Verluste in Höhe von 50 Milliarden US-Dollar weltweit (Boina et al. 2008).

Um dem Befall entgegenzuwirken, werden Wirkstoffe gegen Nematoden eingesetzt. Diese werden in Anthelminthika und Nematizide unterteilt. Erstere umfassen Wirkstoffgruppen zur Bekämpfung des Befalls von Helminthen, was als ein Sammelbegriff für die Cestoden, Trematoden und Nematoden verstanden wird. Nematizide hingegen sind laut Begriffsdefinition chemische Pestizide, die gegen pflanzenparasitische Nematoden wirkungsvoll sind (Holden-Dye und Walker 2014).

Die Anwendung dieser Wirkstoffe, insbesondere eine chemikalienbasierte Behandlung von Nematoden, gestaltet sich als Herausforderung, da die meisten Pflanzenparasiten im Boden oder in Pflanzen leben. Aus diesem Grund ist es schwierig ein Nematizid in die direkte Umgebung der Nematoden zu bringen, zumal die Kutikula der Nematoden gegen-



über den meisten organischen Substanzen impermeabel ist (Chitwood 2003b). Ein Nematizid kann Pflanzenparasiten nicht über deren Nahrung verabreicht werden, da die Pflanze und deren Inhaltsstoffe die Nahrungsquelle für Pflanzenparasiten ist.

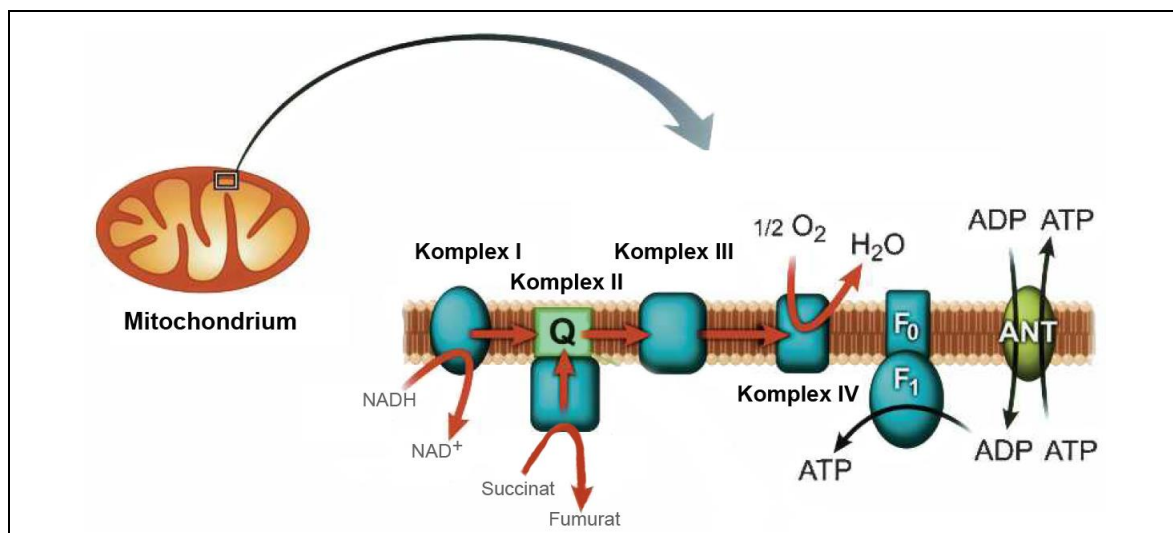
Daraus resultierte in den vergangenen Jahren die Verwendung von Stoffen, die sowohl der Umwelt, als auch dem Menschen gegenüber toxisch sind (Ethylendibromid, Methylbromid etc.). Effekte auf Nicht-Zielorganismen bedeuten eine Umstrukturierung der Bodenbeschaffenheit, d. h., dass beispielsweise das Vernichten von Bakterien und Pilzen zu einem geringerem Pflanzenwachstum führt (Chitwood 2003a). Aufgrund ihrer negativen Auswirkungen auf die Gesundheit der Menschen wurde der Einsatz einiger Fungizide wie Carbamate und Organophosphate gesetzlich verboten (Bailey et al. 2016). Aus den genannten Gründen ergibt sich die Notwendigkeit für Investitionen in neue Wirkstoffe gegen Nematodenbefall, welche die Umwelt nicht belasten und weniger giftig für ihre direkte Umgebung sind.

### 1.3 Die mitochondriale Elektronentransportkette als Angriffspunkt neuer Nematizide

Die Inhibition der Elektronentransportkette durch Nematizide und somit die Blockade der Energiegewinnung des Organismus gewinnt zunehmend an Bedeutung. Jegliche Inhibition der Elektronentransportkette führt zu einem verminderten Sauerstoffverbrauch, verlangsamt die Prozesse der Zelle und sorgt für eine vermehrte Bildung von ROS (Reactive Oxygen Species, Reaktive Sauerstoffspezien).

Das potenzielle Nematizid FP wird in seiner Aktivität als Fungizid als Inhibitor der Succinat-Dehydrogenase, Komplex II, der mitochondrialen Elektronentransportkette beschrieben (Ishii, Miyamoto, et al. 2011). Komplex II wird benötigt, um die Oxidation von Succinat und die Reduktion von Ubichinon zu katalysieren (Hench et al. 2011; Ito et al. 2004). Dieser Enzymkomplex ist sowohl ein funktioneller Teil des Zitronensäure-Zyklus als auch der Elektronentransportkette. Die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase, Komplex II, wird von vier nukleär kodierten Untereinheiten gebildet (SDHA, SDHB, SDHC und SDHD), deren Strukturen und Sequenzen (sowie auch die aller weiteren Elektronentransportketten-Gene) innerhalb der Eukaryoten hoch konserviert sind (Rustin et al. 2002; Riddle et al. 1997).

Die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Elektronentransportkette bildet Reduktionsäquivalente entlang eines Protonenkonzentrationsgradienten, um Adenosintriphosphat (ATP) zu produzieren. Dabei sind die Proteine der Komplexe I-V sowie die Elektronenüberträger Ubichinon und Cytochrom C notwendig. Durch die Einspeisung der Elektronen über Komplex I, die NADH-Dehydrogenase oder Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase, und die Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> oder Succinat zu Fumurat werden Elektronen von Ubichinon auf Komplex III, die Cytochrom-C-Reduktase, übertragen. Elektronen werden dann mittels Coenzym C an Komplex IV, die Cytochrom-C-Oxidase, weitergegeben (Abbildung 1-1). Daran schließt sich die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser an. Komplex V, die ATP-Synthase, nutzt die Energie, die entlang des durch die Komplexe I–IV aufrechterhaltenen Protonengefälles der Membran entsteht, um ADP zu ATP umzuwandeln.



**Abbildung 1-1 | Die mitochondriale Elektronentransportkette.**

Die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Elektronentransportkette besteht aus vier Komplexen, die dem Elektronenaustausch zur Gewinnung von ATP dienen. Elektronen werden von NADH oder Succinat an Komplex I bzw. II und dann zu Ubichinon (Q), Komplex III und letztendlich an Komplex IV weitergegeben. Komplex V, die ATP-Synthase mit der ANT=Adenosin Nukleotide Translokase, benutzt die Energie des Protonengradienten, um ATP zu synthetisieren. Modifiziert nach Aguilaniu et al. (2005).

## 1.4 Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

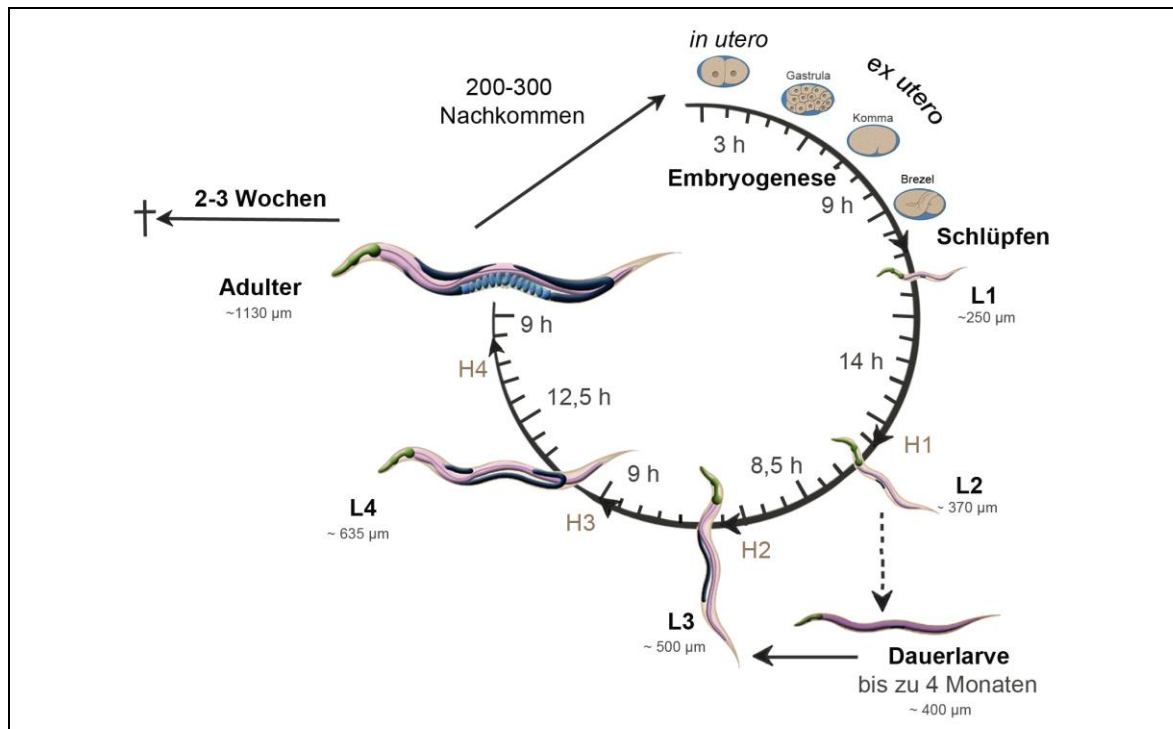
*C. elegans* wird in dieser Arbeit als Modellorganismus verwendet, um das potenzielle Nematizid FP und dessen Auswirkungen auf den Lebenszyklus unter Laborbedingungen zu charakterisieren. Dafür macht man sich zu Nutze, dass sein komplett sequenziertes

Genom eines der am besten analysierten und annotierten eukaryotischen Genome ist, welches neben *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* existiert (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998). Die vollständige embryonale und post-embryonale Entwicklung ist analysiert und die gesamte Zelllinie wurde erforscht (Deppe et al. 1978; Sulston und Horvitz, 1977; Sulston et al. 1983). *C. elegans* hat 959 somatische Zellen (Hermaphrodit), die durch eine invariante Zelllinie entstehen. Dennoch werden hoch differenzierte Zelltypen und Gewebe ausgebildet (Neurone, Muskeln, Darm und Epidermis) (Abbildung 1-4).

Brenner wählte in den 1960er Jahren *C. elegans* zum Modellorganismus als vereinfachtes System für intensive genetische und entwicklungsbiologische Untersuchungen des Nervensystems (Brenner 1974). Weiterhin kann neben der klassischen Genetik die reverse Genetik durch die einfache Anwendung und gute Funktionalität von RNAi (RNA Interferenz) betrieben werden.

Unter Laborbedingungen bekommt der selbstbefruchtende Hermaphrodit durchschnittlich 300 Nachkommen, die sich nach dem Schlüpfen über vier Larvenstadien zum fortpflanzungsfähigen adulten Tier entwickeln (Abbildung 1-2). Die Dauer der einzelnen Larvenstadien ist temperaturabhängig. So dauert die Entwicklung bei +20 °C von L1- zu L2-Larve 14 h, die Weiterentwicklung zur L3-Larve weitere 8,5 h. Die Entwicklung zu einer L4-Larve von einer L3-Larve, die einen kritischen Punkt in der Entwicklung als Checkpoint darstellt, erstreckt sich über 44 h. Die anschließende Zeitspanne zur Entwicklung zum adulten Wurm beträgt 56 h, der wiederum nach insgesamt 65 h in der Lage ist, Eier zu produzieren und abzulegen (Abbildung 1-2). Eine verlängerte oder verzögerte Entwicklungszeit ist bei niedrigeren Temperaturen von z. B. +16 °C zu verzeichnen, wobei eine Haltung bei +25 °C die Generationszeit verkürzt.

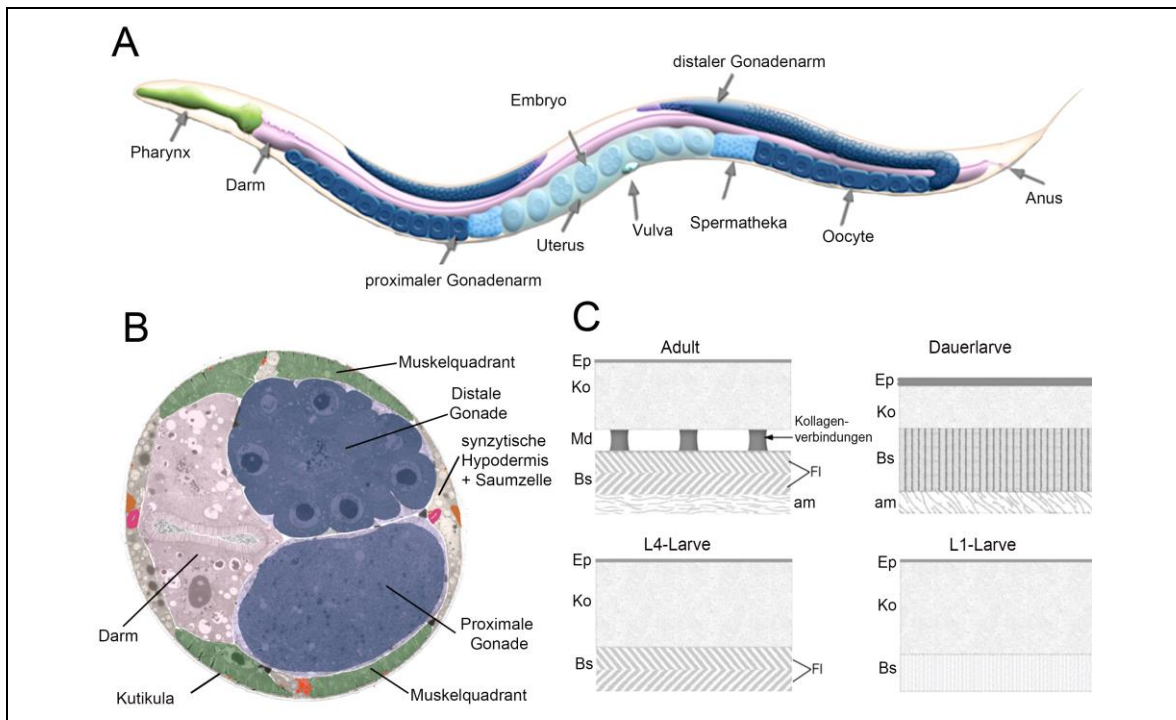
Freilebende Nematoden, wie *C. elegans*, können unter verschiedensten Umweltbedingungen lange überleben oder sich ausbreiten, indem sie in ein alternatives Entwicklungsstadium eintreten und Dauerlarven ausprägen (Abbildung 1-2). Dauerlarven haben eine Kutikula mit einer dickeren Epidermis, vergleichbar mit den infektiösen Stadien von Pflanzenparasiten.



**Abbildung 1-2 | Der Lebenszyklus von *C. elegans*.**

Entwicklung eines hermaphroditischen *C. elegans* bei +20 °C auf Agarplatten unter Laborbedingungen. Schematisch dargestellt sind die Entwicklungsstadien von einem befruchteten Ei (nach der ersten Teilung) über die Embryogenese-Stadien (*ex utero*). Vom 2-Zell- bis zum 30-Zell-Stadium findet die Entwicklung *in utero* statt. Die darauffolgende *ex utero* Embryogenese durchläuft diverse Morphogenesestadien von der Bohne bis zur Brezel. Angeschlossen an die Embryogenese folgt das Schlüpfen und das Wachstum der vier verschiedenen Larvenstadien (mit den Häutungen H1-H4) bis zum adulten, fortpflanzungsfähigen Wurm. Der alternative Entwicklungsweg der Dauerlarve ist rechts gezeigt. Dies bezeichnet ein Stadium, das zur Überbrückung schlechter Umweltbedingungen bis zu 4 Monate gehalten werden kann, um das Wachstum weiterhin garantieren zu können. Schematische Darstellung der anatomischen Strukturen: grün: Pharynx, blau: Gonade, pink: Darm, hellblau: Embryonen. Modifiziert nach [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org).

Während des Wachstums über vier Larvenstadien wird die Kutikula bei jeder Häutung abgestoßen. Zuvor wurde eine neue Kutikula sezerniert, die nach der Häutung erhärtet und größer wird. Je nach Entwicklungsstadium von *C. elegans* werden vier verschiedene Kutikula-Typen unterschieden, die in L1-, Dauer-, L4- und den Adulten-Typ unterteilt werden (Edgar et al. 1982). Während sich die adulte Kutikula durch ihre Medianschicht, einen flüssigkeitsgefüllten Raum mit Kollagen-Verbindungen auszeichnet, unterscheiden sich die anderen drei Typen durch die Dicke der Basal- sowie Kortex-Schicht (Abbildung 1-3). Die L4-Kutikula hat eine Basalschicht, die mit der fibrillären Schicht des Adulten zu vergleichen ist.



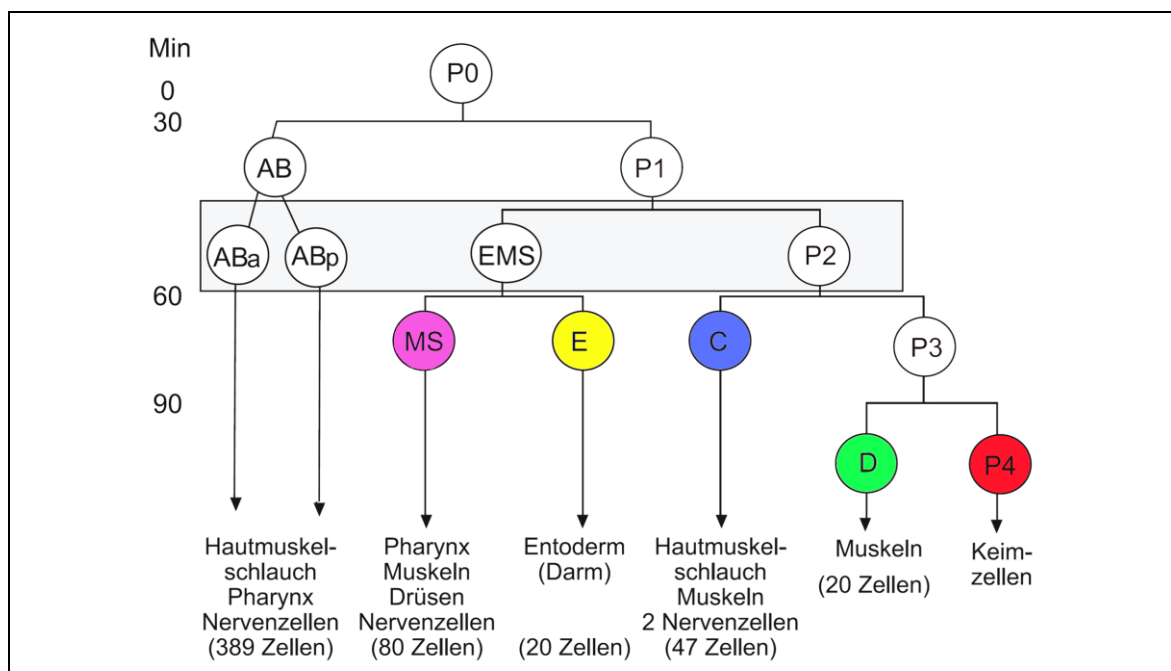
**Abbildung 1-3 | Anatomie eines adulten Hermaphroditen und Aufbau der Kutikula in verschiedenen Entwicklungsstadien von *C. elegans*.**

Aufbau eines hermaphroditischen Wurms. **A)** Schematischer Längsschnitt eines adulten Hermaphroditen (anterior-links). Er besitzt zwei U-förmige Gonadenschläuche (blau), ein Verdauungssystem aus Pharynx (Vorderdarm; grün), Darm (Mitteldarm, Hinterdarm; rosa) und Anus. **B)** Elektronenmikroskopischer Querschnitt durch einen adulten Wurm (links-rechts orientiert, mit dorsal oben und ventral unten). Die Muskelstränge (grün) verlaufen in vier longitudinalen Quadranten. Die unter der Kutikula liegende Hypodermis und die Saumzellen bilden ein Synzytium. Die distale und proximale Gonade mit Oogonien bzw. Oozyten sind in blau dargestellt. **C)** Darstellung des Aufbaus der Kutikula in verschiedenen Entwicklungsstadien von *C. elegans*. Ep=Epikutikula, Ko=Kortexschicht, bestehend aus Kollagen, Md=Medianschicht mit Kollagenverbindungen, Bs=Basalschicht, zusammengesetzt aus einer amorphen (am) und zwei fibrillären Kollagenschichten (FI). Abbildungen verändert nach wormbook.org (A, B) wormatlas.org (C).

*C. elegans* besitzt einen einfachen Bauplan, sodass seine Entwicklung Zelle für Zelle beobachtet werden kann (Schierenberg und Cassada, 1986). Die Leibeshöhle von *C. elegans*, das flüssigkeitsgefüllte Pseudocoel, dient als Verteilersystem von Nährstoffen und zum Aufbau des hydrostatischen Drucks. Im Pseudocoel liegt neben Darm und Pharynx, welche den Verdauungstrakt bilden, die Gonade, die bei Hermaphroditen paarig angelegt ist. Nematoden haben einen einfachen, durchgehenden Darm. Die Muskelzellen sind in vier Längsstreifen entlang des Tieres angeordnet und bilden Fortsätze zu den Nervenzellen aus (Campbell et al. 2006). Die Längsmuskulatur ermöglicht durch Kontraktion die charakteristisch schlängelnde Fortbewegung des Wurms.

Die Embryogenese von *C. elegans* ist durch die Analyse der somatischen Gründerzellen sowie der beteiligten Gene, die das Blastomerenschicksal und Gewebeschiedsal festlegen, genau entschlüsselt (Abbildung 1-4). Aufgrund seiner transparenten Kutikula konnte der

komplette Zellstammbaum mit dazugehörigen Zellteilungen und Bildung der Achsen mittels 4-D-Mikroskopie aufgeklärt werden (Schnabel und Priess 1997). Die Auswertung der Zeitraffer 4-D-Analyse erfolgt mittels computerbasierter Zellteilungsrekonstruktionen, z. B. Simi BioCell (Schnabel et al. 1997). Charakteristisch für die frühe Embryogenese von *C. elegans* sind essentielle asymmetrische Zellteilungen, die zur Entstehung der fünf somatischen Gründerzellen AB, MS, E, C, D und der Keimbahnvorläuferzelle P4 führen (Sulston et al. 1983) (Abbildung 1-4). Die Hüllen des Embryos bieten mechanische Stabilität und eine chemische Permeabilitätsbarriere (Olson et al. 2012).



**Abbildung 1-4 | Vereinfachter Zellstammbaum von *C. elegans*.**

Die Keimbahnvorläuferzellen (P0=Zygote, P1, P2 und P3) durchlaufen eine Reihe von asymmetrischen Zellteilungen, um die fünf somatischen Gründerzellen (AB, MS, E, C und D) zu generieren (Sulston et al. 1983). Alle Blastomeren eines *C. elegans* Embryos haben eine invariante Abfolge von Zellteilungen, die mittels 4-D-Analyse, zurückverfolgt werden können. Die invariante Zelllinie der Gründerzellen dient somit als Referenz der Embryogenese in einem räumlichen und zeitlichen Zusammenhang (Zeit in Minuten nach Befruchtung). Modifiziert nach Müller und Hassel (2006).

Die meisten parasitären Nematoden, denen die Anwendung eines Nematizids im Grunde gilt, können nicht kultiviert und unter Laborbedingungen gehalten werden. Im Gegensatz dazu erlauben insbesondere der kurze Lebenszyklus von zwei bis drei Tagen und die schnelle Generationszeit von *C. elegans* die Haltung, Manipulation und Observierung in großer Anzahl (Chaweeborisuit et al. 2016). Die Kultivierung erfolgt auf NGM-Agarplatten, welche mit *E. coli* (OP50) Bakterienrasen (als Nahrungsquelle) bedeckt sind (Brenner 1974). Der Fadenwurm *C. elegans* wird in vielen verschiedenen Forschungsge-

bieten als Modellorganismus angewendet und verstärkt in pharmakologischen Screens verwendet (Artal-Sanz et al. 2006; Burns et al. 2006; Burns et al. 2015; Holden-Dye und Walker 2014). In Wirkstoffscreenings für Nematizide wurde *C. elegans* bereits als Modellorganismus stellvertretend für Parasiten verwendet (Burns et al. 2015).

Aufgrund des invariablen Zellstammbaums von der Zygote bis zum adulten Wurm und des Wissens um die komplette Anatomie auf mikroskopischer Ebene bietet *C. elegans* eine ideale Grundlage, um nach experimenteller Manipulation das Schicksal jeder einzelnen Zelle zu verfolgen und Abweichungen von der Norm umgehend erkennen zu können. Somit soll sowohl der Effekt der FP-Behandlung auf den Lebenszyklus von *C. elegans* unter Laborbedingungen als auch der molekulare Wirkmechanismus analysiert werden.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Fluopyram (FP) ist ein Breitspektrum-Fungizid der chemischen Klasse der Pyridylethylamiden und inhibiert die Succinat-Dehydrogenase, Komplex II der mitochondrialen Elektronentransportkette. Nachdem FP zuvor als Fungizid verwendet wurde, wird es seit Kurzem auch gegen pflanzenparasitäre Nematoden eingesetzt (1.1). Das Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der Wirkungsweise subletaler und letaler FP-Konzentrationen auf den Lebenszyklus von *C. elegans*. Folgende Ziele sollten erreicht werden:

1. Etablierung eines FP-Assays unter Laborbedingungen zur Ermittlung der subletalen und letalen Konzentrationen von FP bezüglich der embryonalen und postembryonalen Entwicklung von *C. elegans* und der Entwicklung anderer freilebender Nematoden.
2. Identifizierung des Aufnahmemechanismus von FP in *C. elegans* (Darmtrakt versus Kutikula).
3. Mikroskopische Charakterisierung des mitochondrialen Netzwerkes in der Muskulatur und im Darmtrakt von *C. elegans* mit und ohne FP-Behandlung.
4. Analyse des nematiziden Effekts von FP auf den Lebenszyklus von *C. elegans* Stämmen, die Mutationen in der mitochondrialen Elektronentransportkette aufweisen.
5. Durchführung eines klassischen F2 Mutagenese Screens in *C. elegans* und Identifizierung bzw. Charakterisierung von Mutanten, die eine Resistenz gegenüber FP aufweisen.
6. Speziesübergreifende, molekulargenetische und phylogenetische Charakterisierung der Angriffsstelle von FP im Succinat-Dehydrogenase-Komplex der mitochondrialen Elektronentransportkette.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien, Chemikalien und Geräte

Das verwendete Labor-Equipment (z. B. Petrischalen, Pipettenspitzen) wurde hergestellt von der Eppendorf AG (Hamburg), der SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht) und der BRAND GmbH + Co KG (Wertheim). Sämtliche Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert.

Die Chemikalien wurden von den folgenden Herstellern bezogen: Roth-Chemie GmbH (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), AppliChem GmbH (Darmstadt) und Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz). Weiterhin wurden die nachfolgend aufgeführten Reaktions-Kits (Tabelle 2-1) und Geräte (Tabelle 2-2) genutzt.

Tabelle 2-1 | Verwendete Reagenziensätze.

Reagenziensätze (Kits)	Hersteller
ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System	Promega Corporation, Madison (USA)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific Inc, Dreieich
KAPA2G Fast ReadyMix mit Dye	Kapa Biosystems, London (England)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren

Tabelle 2-2 | Verwendete Geräte, Modellbezeichnung und Hersteller.

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Systec V-65	Systec GmbH, Linden
Binokular	Stemi 2000 Lampe KL200	Carl Zeiss AG, Jena
Brutschrank	function line B12	Heraeus Kulzer, Hanau
Brutschrank	IPS	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Deckgläser	24 x 50 mm, 18 x 18 mm, 24 x 24 mm	VWR International GmbH, Langenfeld
Dispergiergerät	ULTRA-TURRAX	IKA Werke, Staufen
Feinwaage	Precissa 321 LS 220A	Precissa Gravimetrics AG, Dietikon (Schweiz)
Fluoreszenzbinokular	Leica MZ 16 FA + KL1500LCD	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
	Nikon AZ100M	Nikon GmbH, Düsseldorf
Dokumentation der Agarosegele	VisiDoc-It Imaging System	Analytik Jena AG, Jena

Gerät	Typ	Hersteller
<b>Geldokumentation Drucker</b>	Mitsubishi Electric Video Copy Processor CP900DW	Mitsubishi Electric, Ratingen
<b>Heizschüttler für Reaktionsgefäße</b>	Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Kamera</b>	EOS 6D	Canon GmbH, Krefeld
<b>kompakter Laborschüttler</b>	RS-LS5 Linear	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen
<b>Magnetrührer mit Heizung</b>	RCT-Basic	IKA Werke, Staufen
<b>Membranvakuumpumpe</b>	Vac-Man Laboratory Vakuum Manifold	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
<b>Mikroliterzentrifugen</b>	Z216M, Z216MK mit Kühlsystem	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen
<b>Mikroplatten-Reader</b>	FLUOStar Omega	BMG Labtech, Ortenberg
<b>Minizentrifuge</b>	SPROUT 12V	Heathrow Scientific, Vernon Hills (USA)
<b>Nano Photometer</b>	P-class P330 (LID 10 + 50)	Implen GmbH, München
<b>Objektträger</b>	76 x 26 mm	R. Langenbrick, Emmendingen
<b>PCR Maschine</b>	Mastercycler personal/gradient	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Photometer</b>	Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Pipetten</b>	Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Pumpe</b>	INTEGRA Dose it	IBS Integra Biosciences, Zizers (Schweiz)
<b>Schüttelinkubatoren</b>	INFORS HT - Minitron	INFORS HT, Basel (Schweiz)
<b>Stereomikroskop</b>	Stemi 508	Carl Zeiss AG, Jena
<b>Sterilbank</b>	Holten Lamin Air	IBS Integra Biosciences, Zizers (Schweiz)
<b>Strom für Gelkammer</b>	PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories Ltd., Hertfordshire (England)
<b>Trockenschrank</b>	WTC	Binder GmbH, Tuttlingen
<b>Universalzentrifuge</b>	Z446K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen
<b>UV Transilluminatoren</b>	UV Transilluminator 312 nm/ 160 x 200 mm	INTAS GmbH, Göttingen
<b>Vortex</b>	Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
<b>Waage</b>	Präzisionswaage Talent TE4101	Sartorius AG, Göttingen
<b>Wasserbad</b>	GFL 1008	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Bakterienstämme

Als Nahrungsquelle für *C. elegans* diente der Uracil-abhängige *Escherichia coli* Stamm OP50 (CGC, Minnesota) nach Brenner (1974). Des Weiteren wurden zum Klonieren folgende *E. coli* Stämme verwendet (Tabelle 2-3).

Tabelle 2-3 | Verwendete Bakterienstämme mit Genotyp.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Verwendung
OP50	Ura <sup>-</sup> , Str <sup>R</sup>	Fütterungsbakterien für <i>C. elegans</i>
HT115 (DE3)	<i>F</i> -, <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>mc14::Tn10(DE3 lysoge:lavUV5 Promoter -T7 Polymerase)</i> (IPTG - induzierbare T7 Polymerase) ( <i>RNase III minus</i> )	Fütterungsbakterien für RNAi-Experimente
DH5α	<i>Φ80lacZΔM15</i> , <i>ΔlacZYA-argF</i> U169, <i>deo</i> <sup>R</sup> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>)</i> , <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>λ</i> -, <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Amplifikation von Plasmid-DNA
XL1-Blue	<i>endA1</i> , <i>gyrA96(nalR)</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , <i>glnV44</i> , <i>F[Tn10 proAB+lacIq Δ(lacZ)M15]</i> , <i>hsdR17(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>)</i>	Amplifikation von Plasmid-DNA

### 2.2.2 Medien zur Kultivierung von Bakterienstämmen

Die verwendeten Medien und ihre Zusammensetzung zur Kultivierung von Bakterien sind im Folgenden aufgelistet. Zur Selektion anhand von Resistenzen werden den jeweiligen Medien Antibiotika in einer Verdünnung von 1:1.000 zugegeben (Ampicillin [Stock 100 mg/ml], Tetracyclin [Stock 12,5 mg/ml]).

#### LB

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl
- bezogen auf 1 l Gesamtvolumen

#### LB Agar

- 15 g Agar per 1 l LB

### 2.2.3 Isolierung und Sequenzierung genomischer DNA

Die Präparation genomischer DNA wird mittels des Reaktions-Kits ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System isoliert (Tabelle 2-1). Die genomische DNA wird für die Sequenzierung der Genome isolierter Mutanten aus einem Mutagenese Screen verwendet (2.7 und 3.6).

- Eine Mischkultur von adulten Würmern und Eiern von abgefressenen Agarplatten wird gesammelt (10-15 Platten (9 cm)).
- Die Würmer werden mit Wasser abgespült und in einen 50 ml Falcon übertragen.
- Befreiung der Wurmsuspension von restlichen Bakterien mit Penicillin Streptomycin Mix (10.000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin per ml in 0,9 % NaCl, Sigma-Aldrich).
- Aufbrechen der pelletierten Wurmsuspension durch Mörsern in flüssigem Stickstoff.
- Das gefrorene Wurmpulver wird gemäß Hersteller-Protokoll weiter (als Probe) verarbeitet.
- Das finale Eluat, gelöst in TrisCl (10 mM, pH 8), beinhaltet zur weiteren Verwendung fertig aufgereinigte, genomische DNA.
- 10 µl der genomischen DNA werden zur Qualitätskontrolle auf ein 0,8 % Agarose Gel (mit TAE Puffer) aufgetragen und zusätzlich zur Konzentrationsbestimmung mit dem Nanophotometer analysiert (2.2.12 und 2.2.13).

Für die Genomresequenzierung wurde die Firma GATC Biotech (Konstanz) beauftragt. Hierbei wird zunächst für jede eingesendete DNA eine Standard genomische Library erstellt. Dies geschieht durch die DNA-Fragmentierung und die Ligation von Adaptern an die entsprechenden Fragmente. Diese Konstrukte werden nach ihrer Größe selektiert (125 bp) und auf einer Flowcell<sup>2</sup> amplifiziert.

GATC Biotech führt die Sequenzierung mit einem Illumina Endgerät im Pair End-Modus<sup>3</sup> durch. Dazu wird die amplifizierte Flowcell in den Genomanalyzer gegeben, damit die einzelnen Basen durch Aufnahme von fluoreszenten, reversiblen Terminator-Nukleotiden gelesen werden können (Quail et al. 2009).

---

<sup>2</sup> Eine Glasplatte deren Oberfläche mit einzelsträngigen Oligonukleotiden, die zu den Sequenzen der Adapter korrespondieren, bedeckt ist.

<sup>3</sup> Sequenzierung ausgehend von beiden Enden des Fragments. Erhöht die Wahrscheinlichkeit SNPs in genomischen Sequenzen zu identifizieren.

### 2.2.4 RNA Isolierung

Die Isolierung der mRNA aus verschiedenen Nematoden erfolgt mittels TRI-Mix (verändert nach Chomczynski und Sacchi (1987)). Das verwendete Gewebe wird aufgeschlossen, indem es in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend für 30 min in TRI-Mix mit einem Dispergiergerät homogenisiert wird. Anschließend wird das Homogenisat zur Isolation der gesamten mRNA wie folgt behandelt:

- Das Homogenisat wird nach dem Vortexen für 5 min inkubiert (RT).
- Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wird gevortext und 5 min bei RT inkubiert.
- Durch 10 min Zentrifugation bei 15.000 x g werden die zwei Phasen getrennt.
- Die obere mRNA-enhaltende Phase (ca. 0,8 µl) wird in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µl 1 M Essigsäure und 0,4 µl EtOH (100 %, -20 °C) versetzt.
- Anschließend folgt die Präzipitation für mindestens 4 h (-20 °C).
- Nach 20 min Zentrifugation (15.000 x g) liegt die mRNA in einem Pellet vor.
- Nach Entfernung des Überstandes wird das mRNA-Pellet für 10 min getrocknet.
- Die 2. Fällung beinhaltet die Resuspendierung des Pellets mit 125 µl Gu-Mix und die Zugabe von 3,125 µl 1 M Essigsäure sowie 70 µl EtOH (100 %, -20 °C).
- Anschließende Präzipitation für mindestens 4 h (-20 °C).
- Nach 20 min Zentrifugation (15.000 x g) liegt die gefällte mRNA in einem Pellet vor.
- Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet zweimal mit 70 % EtOH gewaschen.
- Aufnahme der RNA in 20 µl dH<sub>2</sub>O.
- Bestimmung der Qualität und der Konzentration der isolierten RNA durch das Auftragen von 2 µl auf ein 1%iges Agarosegel und der zusätzlichen Messung mit dem Nanophotometer (siehe 2.2.12 und 2.2.13).

#### Guanidiniumthiocyanat-Lösung

4 M Guanidiniumthiocyanat (GuSCN)

0,5 % Sarcosyl

25 mM NaCitrat, pH 7

- Die Lösung wird zur besseren Löslichkeit des GuSCN auf +65 °C erhitzt.

### Gu-Mix

360 µl β-Mercaptoethanol

50 ml Guanidiniumthiocyanat-Lösung

### TRI-Mix

500 µl Gu-Mix

500 µl Phenol, pH 4

100 µl 2 M NaAcetat, pH 4,2

- Um RNase freie Lösungen zu erhalten werden alle Lösungen mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> angesetzt.

## 2.2.5 cDNA Synthese

Nach der RNA Isolierung erfolgt die Umschreibung in die komplementäre DNA (cDNA aus dem Englischen complementary DNA). Für die cDNA Synthese wird 5 ng der zuvor isolierten mRNA (2.2.4) eingesetzt (Tabelle 2-4).

*Tabelle 2-4 | Reverse Transkription.*

---

### **cDNA Synthese Ansatz**

---

5 ng RNA (max. Volumen 11 µl)

2 µl 3'CDS (Tabelle 2-7)

- 5 min +70 °C

1 µl RNase Inhibitor Ribolock (Fermentas)

4 µl 5x Puffer (Fermentas)

1 µl dNTP Mix (10 mM)

- 2 min +43 °C

1 µl Reverse Transkriptase

---

Nach weiteren 90 min bei +43 °C, in der die RNA in cDNA transkribiert wird, liegt die cDNA zur Verwendung für die PCR vor (2.2.6).

## 2.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Das Verfahren wird verwendet, um eine spezifische DNA-Sequenz zu amplifizieren. Dies geschieht durch die zyklische Abfolge aufeinanderfolgender Schritte (Tabelle 2-6) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Die Temperatur der Oligomerhybridisierung, dem

Annealing, ist abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide, während die Dauer der Elongation abhängig von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz ist (Tabelle 2-6) (Mullis et al. 1986). In Tabelle 2-5 ist die Zusammensetzung einer KAPA2G Reaktion aufgeführt. Diese Reaktion basiert auf der KAPA2G Fast DNA Polymerase, deren Resultate wiederum vergleichbar mit Fragmenten aus einer Reaktion mit der Wildtyp Taq-Polymerase sind, abgeleitet von *Thermus aquaticus* (Clark 1988).

Des Weiteren kann dieser Ansatz zur Verifizierung von korrekt klonierten Konstrukten vor der Plasmid-DNA-Präparation verwendet werden (2.2.11). Bei der Kolonie-PCR wird das gewünschte Fragment direkt aus einer plasmidhaltigen Bakterienkolonie amplifiziert. Hierzu werden vektorspezifische Oligonukleotide verwendet (Tabelle 2-7). Da zu Beginn der PCR zunächst die Zellen zerstört werden müssen, um die DNA freizusetzen, wird ein zusätzlicher Denaturierungsschritt von 5 min bei +96 °C vor das PCR Programm gesetzt (Tabelle 2-6). Durch Agarosegelelektrophorese wird anschließend überprüft, ob ein DNA-Fragment der richtigen Größe vorliegt (2.2.13).

Tabelle 2-5 | PCR Reaktions-Ansatz (KAPA2G Fast Ready Mix mit Dye).

Komponente	25 µl Volumen	Finale Konzentration
2x KAPA2G Fast ReadyMix	12,5 µl	1x
10 µM vorwärts Oligonukleotid	1,25 µl	0,5 µM
10 µM rückwärts Oligonukleotid	1,25 µl	0,5 µM
DNA Matrize	0,1-1 ng	0,1-1 ng
dH <sub>2</sub> O	auffüllen auf 25 µl	

Tabelle 2-6 | PCR Reaktion.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	+95 °C	3 min	1
Denaturierung	+95 °C	10–15 s	} 25-40
Annealing	+60 °C	10–15 s	
Elongation	+72 °C	1-15 s/kb	
Finale Extension	+72 °C	1 min/kb	1

### 2.2.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide für PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe des Programms Geneious (2.3.1) entworfen und von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder Metabion

GmbH (Planegg) bezogen. Genspezifische Oligonukleotide entsprechen in ihrer Sequenz Abschnitten der zu amplifizierenden DNA-Matrize. Sie dienen während der PCR als Ansatzpunkt der Polymerase. Die Oligonukleotide (Tabelle 2-7) werden zu einem 100 mM Stock vorverdünnt und eine 1:10 Verdünnung dieser Lösung wird für die endgültige Anwendung benutzt.

Tabelle 2-7 | Oligonukleotide mit Sequenz.

Oligomer-Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' zu 3')
<b>3'CDS</b>	Zur cDNA Synthese	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTNN
<b>pPD129.36 for</b>	vorwärts	GATAACCGTATTACCGCCTTTG
<b>pPD129.36 rev</b>	rückwärts	CGATTAAGTTGGGTAACGCCA
<b>sdhb-1 for</b>	vorwärts	GAAGACCGGAAACCGTATCA
<b>sdhb-1 rev</b>	rückwärts	CGCTGCTTACTGGATTCACA
<b>sdhc-1 for</b>	vorwärts	GATGATTAACATTCCAACGTC
<b>sdhc-1 rev</b>	rückwärts	ACGGAAAAGAGAGAAAATCGAAG
<b>sdhd-1 for</b>	vorwärts	AAAAATCGCATTGATATTCGCTA
<b>sdhd-1 rev</b>	rückwärts	AACTCGGAATAATCTTGAGGC

## 2.2.8 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme haben die Eigenschaft doppelsträngige DNA an sequenzspezifischen Positionen zu schneiden. Somit ist es möglich die Sequenz anhand ihres Schnittmusters oder ihrer Gesamtlänge mit ausgewählten Enzymen zu verifizieren (verwendete Enzyme von Thermo Fisher Scientific, Dreieich). Der Ansatz zur Restriktion (Tabelle 2-8) wird 2 h bei +37 °C inkubiert und anschließend durch Agarosegelelektrophorese (2.2.13) überprüft.

Tabelle 2-8 | Restriktionsverdau-Ansatz.

Restriktionsansatz	20 µl
<b>DNA aus Minipräparation oder PCR</b>	1 µl
<b>Enzym</b>	0,5 µl
<b>bei Bedarf 2. Enzym</b>	0,5 µl
<b>10x Puffer (enzymspezifisch)</b>	2 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	auffüllen auf 20 µl



### 2.2.9 Ligation, T/A Klonierung

Durch eine Ligation wird ein PCR Produkt in einen Vektor eingebaut. Diese Methode der T/A Klonierung wird durch die Eigenart der Taq-Polymerase, bei ausreichender Elongationszeit Adeniphosphate an die 3'-OH Enden des PCR Produkts zu hängen, ermöglicht. Das mit EcoRV geschnittene Plasmid, das als Vektor dient, verfügt wiederum über Thymin Reste an den 3'-OH Enden und ist somit mit dem PCR Produkt zu ligieren. Für die Klonierung und Sequenzierung wird der pBluescript II KS(+) Vektor verwendet. Dieses Plasmid enthält ein Ampicillin Resistenz-Gen zur Selektion. Eine Ligation setzt sich aus den nachfolgend aufgeführten Komponenten zusammen und wird bei +16 °C über Nacht inkubiert (Tabelle 2-9).

Tabelle 2-9 | Ligations-Ansatz.

Ligationsansatz	10 µl
linearisiertes Plasmid	10 ng
DNA aus PCR	50 ng
Ligasepuffer	1 µl
T4 Ligase (5 U/µl, Fermentas)	0,5 µl

### 2.2.10 Transformation von Plasmid-DNA

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA werden die chemisch kompetenten Bakterien *E. coli* DH5α oder XL1-Blue verwendet (Inoue et al. 1990). Die Bakterien werden in 100 µl Aliquots bei -80 °C aufbewahrt. Diese werden zur Transformation auf Eis aufgetaut und 1 µl des isolierten Plasmids (zur Retransformation) oder 10 µl Ligationsansatz (2.2.9) werden hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation auf Eis wird ein Hitzeschock bei +42 °C durchgeführt. Anschließend werden die Bakterien für 1 min auf Eis und daraufhin mit 900 µl LB Medium für 1 h bei +37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach werden sie auf LB Agar, je nach Resistenz, mit dem jeweiligen Antibiotikum zur Selektion positiver Klone ausplattiert.

### 2.2.11 Isolation von Plasmid-DNA

Zur Präparation der Plasmid-DNA wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Diese beruhen beide auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und der Bindung der Plasmid-DNA an eine Kieselgelmatrix unter bestimmten pH-Bedingungen (Birnboim und Doly, 1979; Melzak et al. 1996). Eine Einzelkolonie Bakterien wird in 4 ml LB Medium angeimpft und über Nacht bei +37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation pelletiert (2 min, 8.000 x g).

a)

- Das Zellpellet wird in 200 µl Merlin I (Tabelle 2-10) resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl Merlin II (Tabelle 2-10) im Reaktionsgefäß zehnmal invertiert.
- Zugabe von 200 µl Merlin III (Tabelle 2-10), der Ansatz wird fünfmal invertiert und anschließend 5 min inkubiert (RT).
- Es folgt 10 min Zentrifugation (20.000 x g) (Zelltrümmer, genomische DNA und RNA werden pelletiert).
- Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Merlin IV (Tabelle 2-10) versetzt und anschließend 5 min rotierend vermischt.
- Mit Hilfe einer Membranvakuumpumpe (Tabelle 2-2) wird die an Kieselgel gebundene Plasmid-DNA über eine Säule mit Potassium Wash (Tabelle 2-10) gewaschen und getrocknet.
- Die Plasmid-DNA wird in 50 µl 10 mM Tris, pH 8,5 (vorgewärmt auf +70 °C) über die Säule eluiert.

Tabelle 2-10 | Plasmid Mini Präparation Puffer.

Merlin I	Merlin II	Merlin III	Merlin IV	Potassium Wash
50 mM TrisCl (pH 7,6)	0,2 M NaOH	61,35 g Kalium-acetat	66,84 g Guanidinium-hydrochlorid	80 mM Kaliumacetat
10 mM EDTA	1 % SDS	35,7 ml Eisessig	33,33 ml Merlin III	8,3 mM Tris (pH 7,5)
100 µg/ml RNase A	ad 100 ml dH <sub>2</sub> O	ad 500 ml dH <sub>2</sub> O	pH 5,5 (mit 10 M NaOH einstellen)	40 µM EDTA
ad 100 ml dH <sub>2</sub> O			ad 100 ml dH <sub>2</sub> O	55 % EtOH (100 %)
			1,5 g Kieselgel 60	ad 100 ml dH <sub>2</sub> O

b)

Alternativ wird die Präparation von Plasmid-DNA mit Hilfe eines Reaktions-Kits durchgeführt, das auf der Membrantechnologie auf Silikabasis in Form einer Spinsäule basiert (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Tabelle 2-1).

### 2.2.12 Photometrische Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von DNA

Die DNA wird über Spektralphotometrie auf einem Nanophotometer (Tabelle 2-2) quantifiziert. Die Qualität der DNA wird durch die Absorbanz bei 260/280 nm bestimmt. Idealerweise liegt der Quotient für reine DNA bei etwa 1,8. Ein weiterer Quotient - Absorbanz bei 260/230 - wird ebenfalls hierfür herangezogen. Dieser sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen.

### 2.2.13 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente werden zur Analyse gelelektrophoretisch aufgetrennt. In dieser Agarosegelelektrophorese konnte weiterhin die Konzentration der DNA bestimmt werden. Die DNA wandert aufgrund der pH-Bedingungen und der negativ geladenen Phosphatreste zur positiv geladenen Anode.

- Agarose bildet ein großporiges Gel, das zur Auftrennung von PCR Produkten und Restriktionsverdauen genutzt wird (1%iges Gel (mit 1X TAE Puffer) entspricht 150 nm Porengröße).
- Bevor die erhitzte Agarose-Lösung abkühlt, wird das Nukleinsäuren-anfärbendene HDGreen DNA-Dye (Intas GmbH, Göttingen) zugegeben (4 µl per 100 ml Gel).
- Die Gele laufen in Kammern, die mit 1X TAE Puffer bedeckt sind.
- Die aufzutrennenden Proben werden nebeneinander in Taschen aufgetragen. Sie werden dafür zuvor mit 6-fach Ladepuffer versetzt (DNA Gel Loading Dye (6 x), Thermo Fisher Scientific).
- Zudem wird ein standardisierter Marker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) aufgetragen.
- Die an die Gelkammern angelegte Spannung beträgt 100 V (abhängig von der Gelgröße und prozentualem Anteil der Agarose).

- Anhand der Farbfront kann abgeschätzt werden, wann eine ausreichende Auftrennung erfolgt ist, da im Probenpuffer Bromphenolblau enthalten ist.
- DNA-Fragmente können im Geldokumentationsgerät unter UV-Bestrahlung visualisiert und dokumentiert werden.
- Die Auswertung der Agarosegele findet mit Hilfe eines UV Tisches, einem Geldokumentationsgerät und einem Thermo-Drucker statt (Tabelle 2-2).

#### 50X TAE Puffer

242,28 g      Tris Base

100 ml      0,5 M EDTA pH 8

- pH 7,4 mit Essigsäure einstellen
- Auf 1 l auffüllen mit dH<sub>2</sub>O.

#### 2.2.14 Gelextraktion von DNA

Nach Auswertung der Agarosegele können DNA-Fragmente mit spezifischen Größen mit Hilfe des Markers identifiziert werden, welche dann mit einem Skalpell herausgeschnitten werden. Zum Extrahieren der DNA aus der Agarose wurde das NucleoSpin® Gel Clean-up Reaktions-Kit verwendet (Tabelle 2-1). Je nach Dicke und Gewicht des Gels wird Binding Puffer NTI zugegeben und solange bei +50 °C erwärmt, bis sich der Agaroseblock auflöst (nach Herstellerangaben). Die DNA wird über eine Säule mit einer Silikamembran aufgereinigt und liegt letztendlich gebrauchsfertig in 15 µl Elutionspuffer vor.

#### 2.2.15 DNA-Sequenzierung

Um Plasmide oder PCR-Fragmente zu analysieren, wird die Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger durchgeführt (Sanger et al. 1977). Sequenzierreaktion, Aufreinigung und Sequenzierung wurden von GATC Biotech AG (Konstanz) oder Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Hierzu werden 5 µl PCR Produkt (20-80 ng/µl) oder Plasmid-DNA (80–100 ng/µl) und 5 µl Oligonukleotid 5 µM (5 pmol/µl) benötigt. Die Analyse der Sequenzdaten sowie deren Verwaltung erfolgt mit der Software Geneious (2.3.1).

## 2.3 Bioinformatische Analyse

Um Regionen lokaler Ähnlichkeit zwischen Sequenzen zu finden, wird der Algorithmus ‚The Basic Local Alignment Search Tool‘ (BLAST) genutzt (Altschul et al. 1990). Dabei werden die verschiedenen Logarithmen blastp (Suche in einer Protein-Datenbank mit einer Proteinsequenz als Suchanfrage), blastx (Suche in einer Protein-Datenbank mit einer Nukleotidsequenz als Suchanfrage) und tblastn (Suche in einer Nukleotidsequenz-Datenbank mit einer Proteinsequenz als Suchanfrage) verwendet. Für den Vergleich von Proteinsequenzen wird das MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) Alignment genutzt (Edgar 2004). Als Plattform für diese Softwaresammlungen und für die Sequenzanalyse dient Geneious (2.3.1). Die Berechnung der wahrscheinlichsten phylogenetischen Analysen in Form von Bäumen erfolgt über RAxML (Stamatakis et al. 2005) und Bayesian Inference (Huelsenbeck und Ronquist, 2001).

Die Reads aus der Genomsequenzierung wurden mit Hilfe von BWA (Burrows-Wheeler Alignment Tool) gegen das *C. elegans* Referenz Genom (WS254) gemappt (Li und Durbin 2009), um anschließend mit GATK (McKenna et al. 2010) die Kalibrierung auf Grundlage der Basenqualität und das INDEL (insertion-deletions) Realignment sowie die Duplikat-Entfernung durchzuführen. Letztendlich wurde die Genotypisierung sowie die SNP und INDEL Suche der Proben mit Standard Parametern durchgeführt (DePristo et al. 2011; Van der Auwera et al. 2002). Die SNP Annotation gegen das *C. elegans* Referenzgenom wird mit snpEff finalisiert (Cingolani et al. 2012).

### 2.3.1 Verwendete Software

Die folgende Software dient der Sequenzanalyse, der daran angeschlossenen bioinformatischen Verarbeitung sowie der Auswertung mikroskopisch aufgenommener Bilddaten.

#### 2.3.1.1 Sequenzanalysen und Bioinformatik

- Geneious Pro 6.1.5 Biomatters LTD 2011 ([www.geneious.com](http://www.geneious.com))
- Oligo Calc v. 3.26 ([www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html](http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html))
- RaxML Black Box (Stamatakis et al. 2005)
- CLC Genomics Workbench 9.5 ([www.qiagenbioinformatics.com](http://www.qiagenbioinformatics.com))
- FastQC by Babraham bioinformatics ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk))

### 2.3.1.2 Bildbearbeitung

- Adobe Photoshop CS5 Extended (Adobe Systems, USA)
- AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss AG, Jena)
- Zen 2012 (Blue und Black Edition) (Carl Zeiss AG, Jena)
- Fiji (Schindelin et al. 2012)
- PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC
- Simi BioCell (Schnabel et al. 1997) + 4-D-Viewer und Rotate 0.61
- Integrative Genomics Viewer [www.broadinstitute.org/igv](http://www.broadinstitute.org/igv) (Robinson und Thorvaldsdóttir, 2011)

### 2.3.2 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mit Microsoft Excel (Microsoft Office 2010) durchgeführt. Alle dargestellten Fehlerindikatoren entsprechen der ermittelten Standardabweichung der jeweiligen Mittelwerte.

Es wird der t-Test mit einer zweiseitigen Verteilung verwendet (2 Stichproben, gleiche Varianz (homoskedastisch)). Dabei wird von folgenden Hypothesen, hier am Beispiel der Nachkommen-Zahl nach FP-Behandlung, ausgegangen (Abbildung 3-7).

- $H_0$ : Eine Erhöhung der FP-Konzentration hat keinen Einfluss auf die Anzahl der Nachkommen.
- $H_1$ : Eine Erhöhung der FP-Konzentration führt zu weniger Nachkommen.

Die jeweiligen t-Werte werden in Kombination mit den Freiheitsgraden und dem resultierenden p-Wert angegeben. Der p-Wert gibt an, zu welchem Prozentsatz das Testergebnis auf den Zufall zurückzuführen ist. Dabei sind die verschiedenen Signifikanzniveaus (Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese fälschlicherweise verworfen wird) mit '\*' (\*  $p < 5\%$ , \*\*  $p < 1\%$ , \*\*\*  $p < 0,1\%$ ) gekennzeichnet. Liegt der p-Wert also unter 5 %, wird die  $H_1$ -Hypothese angenommen.

## 2.4 Nematodenkultivierung und Präparation

### 2.4.1 Haltung von *C. elegans* und anderen freilebenden Nematoden

In dieser Arbeit werden der hermaphroditische *C. elegans* Wildtyp Stamm N2 (Variation Bristol), verschiedene *C. elegans* Mutanten und transgene *C. elegans* Stämme verwendet (Tabelle 2-12). Die *C. elegans* Stämme werden auf NGM Agarplatten bei +20 °C kultiviert (Standardbedingungen nach Brenner 1974). Zusätzlich werden fünf weitere, freilebende Nematoden Stämme, zugehörig zu den Holterman Kladen 9, 10 und 11, analysiert (Tabelle 2-13) (Holterman et al. 2006). Um Kontaminationen zu reduzieren, werden diese Stämme auf salzfreien Agarplatten gehalten (Lahl et al. 2003). Als Nahrungsquelle aller zuvor erwähnten Nematoden dient der Uracil-auxotrophe *E. coli* Stamm OP50 (siehe Tabelle 2-3, Tabelle 2-11 und 2.2.2).

#### NGM Agarplatten (4 l)

12 g NaCl

10 g Bacto Pepton

70 g Bacto Agar

- Auffüllen auf 4 l mit dH<sub>2</sub>O. Autoklavieren und nach dem Abkühlen auf +60 °C Zugabe von:

100 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH6

4 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>

4 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>

4 ml Cholesterol (0,4 g Cholesterin + 80 ml 95 % EtOH)

8 ml Nystatin Suspension (10.000 U/ml, (Sigma-Aldrich))

Tabelle 2-11 | Verwendete Volumina der Bakterien aller Versuche auf Agarplatten.

Durchmesser der Kulturschale	60 mm	90 mm
Volumen der Fütterbakterien	500 µl	1.000 µl

Agarplatten mit Wirkstoffen

Zusätze werden direkt in der gewünschten Konzentration mit einer Übernachtskultur *E. coli* Fütterbakterien (optische Dichte bei 600 nm: OD<sub>600</sub>=2,2) versetzt und in den in Tabelle 2-11 beschriebenen Volumina auf die Platte gegeben.

Es wurden folgende Wirkstoffe verwendet:

- Fluopyram (Sigma-Aldrich, MW=396,71 g/mol)
- Flutolanil (ChemService, MW=323,30 g/mol)
- Paraquat (Paraquat dichloride hydrat (Sigma-Aldrich, MW=257,16 g/mol))

Salzfreie Agarplatten (Minimalmedium) (1 l)

20 g Agar Agar

- Auffüllen auf 1 l mit dH<sub>2</sub>O. Autoklavieren und nach Abkühlen Zugabe von:

1 ml Cholesterol

Tabelle 2-12 | Verwendete *C. elegans* Stämme mit Genotyp.

Stamm/Codierung	Genotyp	Quelle
<b>WT (N2)</b>	<i>C. elegans</i> (Wild Isolat)	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
<b>SJ4143</b>	zcls17[ <i>ges-1::GFP(mit)</i> ] V.	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
<b>VC1434</b>	+/ <i>szT1 [lon-2(e678)] I; sdha-1(ok1908)/szT1 X.</i>	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
<b>SJ4103</b>	zcls14 [ <i>myo-3::gfp(mit)</i> ]	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
<b>TK22</b>	<i>mev-1 (kn1) III.</i>	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
<b>VC294</b>	<i>sdhb-1 (gk165)/mIn1 [mls14 dpy-10 (e128)]</i>	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
<b>MQ513</b>	<i>daf-2 (e1370) clk-1(e2519) III.</i>	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
<b>LB10</b>	<i>nuo-1 (ua1)/mnC1 dpy-10(e128) unc-52(e444) II.</i>	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
<b>MT6308</b>	<i>eat-4 (ky5) III.</i>	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
<b>MT6977</b>	<i>snt-1(n2665) II.</i>	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
<b>BJ186</b>	kcls30 [ <i>ifo-1p::ifo-1::yfp, myo-3p::mCherry::unc-54</i> ] III.	Florian Geisler, RWTH Aachen
<b>BJ230</b>	kcls21[ <i>ifb-2p::ifb-2::cfp</i> ]V <i>pept-1::dsred</i>	Christian Abraham, RWTH Aachen
<b>JM125</b>	kcls38 [ <i>pges-1::act-5::yfp</i> ]	James McGhee, Calgary University
<b>BJ49</b>	kcls6 [ <i>ifb-2p::ifb-2::cfp</i> ] IV.	Katrin Hüsken, RWTH Aachen



Stamm/Codierung	Genotyp		Quelle
BE148 /149	<i>rol-9</i> (sc148/149) V.	rechts-drehend	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
CB187	<i>rol-6</i> (e187) II.	rechts-drehend	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
BE15	<i>rol-8</i> (sc15) II.	links-drehend	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
CB754	<i>rol-3</i> (e754) V.	links-drehend	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
BE8	<i>sqt-3</i> (sc8) V.	links-drehend	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
BE13	<i>sqt-1</i> (sc13) II.	links-drehend	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
CB128	<i>dpy-10</i> (e128) II.	DumPY	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre
BE93	<i>dpy-2</i> (e8) II.	DumPY	<i>Caenorhabditis</i> Genetics Centre

Tabelle 2-13 | Andere verwendete freilebende Nematoden.

Nematoda Art/Codierung	Fortplantungsmodus	Klade nach Holterman et al. (2006)	Herkunft
<i>Diploscapter coronatus</i>	parthenogenetisch	9	Paul De Lay, Riverside, CA, USA
<i>Panagrolaimus</i> sp. (PS1159)	parthenogenetisch	10	Marie-Anne Felix, Paris, Frankreich
<i>Propanagrolaimus</i> sp. (JU765)	hermaphroditisch	10	Marie-Anne Felix, Paris, Frankreich
<i>Acrobeloides nanus</i> (ES501)	parthenogenetisch	11	Einhard Schierenberg, Köln
<i>Acrobeloides</i> sp. (PS1146)	hermaphroditisch	11	Marie-Anne Felix, Paris, Frankreich

#### 2.4.2 Generierung von *C. elegans*-Männchen und Verpaarung

Männchen werden zur Verpaarung mit Hermaphroditen benötigt, um Kreuzungsexperimente mit *C. elegans* durchführen zu können. Die Induktion einer Männchen-Population geschieht durch einen Hitzeschock (+30 °C) von mindestens fünf normal bewachsenen *C. elegans* WT Platten. Zur Haltung einer Männchen-Population werden zu einer L4-Larve (Hermaphrodit) jeweils 4-6 junge Männchen auf eine Platte gesetzt und die Platte wird bei +20 °C inkubiert. Aus getrenntgeschlechtlich-befruchteten Eiern entwickeln sich zu einem bestimmten Anteil wiederum Männchen, was eine permanente Männchen-Haltung ermöglicht.

### 2.4.3 Gewinnung von Embryonen

Da die Embryonalentwicklung von *C. elegans* zunächst *in utero* stattfindet (1.4), werden Embryonen früher Entwicklungsstadien durch Aufschneiden von Adulten gewonnen, während ältere Embryonalstadien durch Fluten einer Platte mit vielen abgelegten Eiern gesammelt werden. Anschließend werden die Embryonen verschiedener Stadien unter dem Binokular ausgewählt und mit einer ausgezogenen Pasteurpipette aufgesaugt. Bei den anderen verwendeten freilebenden Nematoden (Tabelle 2-13) wie z. B. *D. coronatus* und *A. nanus* legen fertile Adulte 1-Zell-Stadien ab, so dass diese ausschließlich von der Platte abgesammelt werden können.

## 2.5 RNA vermittelte Interferenz (RNAi) Experiment durch Fütterung dsRNA produzierender Bakterien

Das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) wurde Ende der 90er Jahre in *C. elegans* WT entdeckt (Fire et al. 1998). Bei RNAi wird durch die Präsenz spezifischer doppelsträngiger RNAs (dsRNA) die Expression der komplementären Gene herunterreguliert. Die verwendete methodische Variante ist die „RNA-Fütterung“ nach Timmons et al. (2001). Dabei werden als Futterquelle dsRNA-produzierende Bakterien (Tabelle 2-3) verwendet. Die dsRNA wird intrazellulär durch die RNAi Maschinerie prozessiert und der RNAi-Effekt ausgelöst.

### 2.5.1.1 Herstellung von Agarplatten für RNAi Experimente

Den NGM Agarplatten (2.4.1) werden folgende Antibiotika gemäß der Resistenzen der RNAi Bakterien und des Vektors zugesetzt:

1:1.000 einer 100 mg/ml Ampicillin Stocklösung; 1:1.000 einer 12,5 mg/ml Tetracyclin Stocklösung; 1:500 einer 1 M IPTG-Lösung.

### 2.5.1.2 Herstellung einer *E. coli* Übernachtskultur

Konstrukte für RNAi können einer kommerziell erwerblichen Bibliothek für RNAi-Fütterbakterien entnommen werden, die von Julie Ahringer (Kamath und Ahringer, 2003) erstellt wurde. Alternativ können Fütterungsbakterien durch Klonieren von cDNA-Fragmenten in den pPD129.36 Vektor selbst hergestellt werden. Übernachtskulturen von

transformierten *E. coli* HT115 (DE3) Bakterien (Tabelle 2-3), mit dem Insert der jeweiligen zu interferierenden RNA, werden in 4 ml LB Medium (mit Antibiotika Ampicillin und Tetracyclin) inokuliert. Die Kultur wächst schüttelnd bei +37 °C. Nach Bestimmung der optischen Dichte wird die Kultur am nächsten Tag mit LB-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 1 verdünnt.

#### 2.5.1.3 Animpfen von Fütterungs-Platten mit Übernachtskultur

Um die RNA-Synthese zu induzieren, werden pro 1 ml Übernachtskultur 6 µl 1 M IPTG hinzugegeben. Die Kulturen wachsen weitere 4 h bei +37 °C und werden daraufhin auf die zuvor hergestellten NGM-RNAi Platten (2.5.1.1) aufgetragen (jeweils 500 µl).

#### 2.5.1.4 RNAi durch Fütterung

Das Experiment wird so geplant, dass in jedem Ansatz für den Nachweis der Funktionsweise der RNAi eine Negativkontrolle (pPD129.36 Vektor ohne zu induzierende RNA Sequenz) und eine Positivkontrolle (*let-413*, die postembryonal angewendet zu Sterilität führt (Pilipiuk et al. 2009)), angesetzt werden.

Die RNAi Experimente werden entweder mit Larven oder mit Eiern gestartet. Im ersten Fall werden Larven im L4-Stadium mit Hilfe eines Platindrahts von der Kulturplatte auf die mit Fütterbakterien beimpfte Platte übertragen. Dabei ist auf eine saubere Arbeitsweise zur Verhinderung der Kontamination mit Fremdbakterien zu achten. Das Larvenstadium wird gewählt, damit zum Beginn der Oogenese doppelsträngige RNA im Wurm vorliegt. Eier werden von Kulturplatten abgewaschen und mit einer ausgezogenen Pasteurpipette übertragen. Die Wirkung der RNAi wird ab der Aufnahme von Bakterien (ab Larvenstadium L1) analysiert. Es werden maximal 20 Larven oder Eier auf eine NGM RNAi-Platte pro Ansatz gesetzt (RNAi-Experiment, Positiv- und Negativkontrolle). Die Platten werden bei +20 °C gehalten und täglich bezüglich ihrer Entwicklung und der Nachkommenschaft kontrolliert.

## 2.6 Mikroskopie

### 2.6.1 Stereomikroskopie

Um unter dem Binokular sichtbare Phänotypen zu untersuchen und die Lebendbeobachtung von *C. elegans* auf Agarplatten durchzuführen, werden diese mit dem Binokular Stemi 2000 untersucht (Tabelle 2-2). Die Binokular-Dokumentation wird mit dem Nikon AZ100M und der Kamera Canon EOS 6D ausgewertet (Tabelle 2-2).

### 2.6.2 Licht- und Fluoreszenz-Mikroskopie

Zur Sichtbarmachung von transparenten Strukturen von *C. elegans* werden Aufnahmen von differentiellen Interferenzkontrast Bildern (DIK) nach Nomarski (1955) mittels Prisma und Polarisationsfilter mit Hilfe des Zeiss Axio Imager Z1 durchgeführt (Tabelle 2-14). Die phänotypische Charakterisierung sowie Lebendbeobachtung wird an adulten Würmern, Larven oder Eiern auf 3%igen Agarose-Pads, die gegebenenfalls mit Levamisol (5 mM) anästhesiert werden, durchgeführt. Eine detaillierte Bestimmung von Fluoreszenzsignalen kann mittels konfokaler (Laser-Scanning Mikroskopie) erzielt werden (LSM 880, Tabelle 2-14). Alle Bilder werden mit der zur Aufnahme verwendeten Software AxioVision Rel. 4.8, Zen (Blue oder Black (2012)) (Zeiss) konvertiert und vermessen, bevor sie im Folgenden mit Adobe Photoshop CS5 bearbeitet werden (2.3.1).

Tabelle 2-14 | Mikroskope der Firma Carl Zeiss (Jena) mit Okular, Objektiv und Kamera.

Mikroskop	Axioscop 2 mot plus	Axio Imager Z1 mit ApoTome	Laser-Scanning Mikroskop LSM 880
<b>Okular</b>	PI 10x/23	FLUAR 2,5x/0,12	EC-Plan-NEOFLUAR 10x/0,3
<b>Objektive</b>	A-Plan 5x/0,12	EC-Plan-NEOFLUAR 10x/0,3	LC1 Plan-APOCHROMAT 25x/0,8
	A-Plan 10x/0,25	LC1 Plan-APOCHROMAT 25x/0,8	Plan-APOCHROMAT 63x/1,4 Oil DIC
	Plan-Neofluar 40x/0,75	Plan-APOCHROMAT 40x/0,75 Oil DIC	
	Plan-Neofluar 100x/1,3-0,7 Oil	Plan-APOCHROMAT 63x/1,4 Oil DIC Plan-APOCHROMAT 100x/1,4 Oil DIC	

Mikroskop	Axioscop 2 mot plus	Axio Imager Z1 mit ApoTo-me	Laser-Scanning Mikroskop LSM 880
Kamera	AxioCam MRc	AxioCam MRm AxioCam ICc1	LSM T-PMT

#### 2.6.2.1 Herstellung Poly-L-Lysin beschichteter Objektträger

Teflonbeschichtete Objektträger mit einem Poly-L-Lysin-Film werden verwendet, um Embryonen und Würmer zu fixieren und zu analysieren. Dabei wird die Oberfläche der Objektträger durch die kationischen Poly-L-Lysin Moleküle positiv aufgeladen, wodurch die Haftung der negativ geladenen Probe verbessert wird (Cole und Schierenberg 1986). Dafür werden zunächst Verunreinigungen wie Schmutz und Fett, die sich auf dem Objektträger befinden, mit EtOH entfernt. Nach der Trocknung werden 2 µl Poly-L-Lysin mittels Pipette auf den Objektträger aufgetragen und in schnellen und gleichmäßigen Zügen mit der Spitze verteilt. Letztendlich trocknen diese Objektträger 20 min bei +70 °C.

##### Poly-L-Lysin Lösung:

- 200 ml          dH<sub>2</sub>O
- 400 mg          Gelatine (Lösen bei +60 °C)
- 40 mg          CrK(SO<sub>4</sub>)<sup>2</sup> x 12 dH<sub>2</sub>O
  - gelöst bei +40 °C
- 1 mg/ml          Poly-L-Lysin Hydrobromid (Sigma-Aldrich, MW>300.000 g/mol)
  - Finales Lösen für mindestens 12 h.

#### 2.6.2.2 Formaldehyd-Fixierung für die konfokale Laser-Mikroskopie

Die Expression von mitochondrialen GFP in *C. elegans* SJ4103 *myo-3::GFP(mit)* und SJ4143 *ges-1::GFP(mit)* kann mittels konfokaler Mikroskopie LSM 880 (Tabelle 2-14) gezeigt werden. Dazu werden FP-behandelte Tiere (4 Tage, mit Embryonen beginnend) mit 4 % Paraformaldehyd für 20 min fixiert.

#### 2.6.3 4-D-Video Mikroskopie

Die Lebendanalyse der Entwicklung von Embryonen wird mittels DIC Mikroskopie mit dem 100-fachen Objektiv durchgeführt. Stapelaufnahmen der optischen Ebenen werden

digital in einem Intervall von 1 min bei +23 °C mit der Hilfe eines 4-D-Mikroskops aufgenommen (Axioscope 2 mot, Tabelle 2-14). Die 4-D-Verfolgung des Zellverhaltens und die Entwicklung der Zelllinien kann mittels Software-Unterstützung (Simi Biocell, 2.3) aufgenommen werden.

## 2.6.4 Elektronenmikroskopie

### 2.6.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ermöglicht die ultrastrukturelle Darstellung der Zellen im zu untersuchenden Gewebe. Mit einer maximalen Vergrößerung von 30.000x wird die Wirkung von FP auf die Ultrastruktur von Mitochondrien in *C. elegans* analysiert. Alle elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Mitochondrien in Muskelzellen der anterioren Bereiche des Wurms. Hierzu werden *C. elegans* WT und die *mev-1* Mutante jeweils für sechs Tage auf Agarplatten mit *E. coli*/FP in den Konzentrationen 8 und 10 ppm behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Würmer gleichen Alters.

- Die verschieden inkubierten und behandelten Würmer werden mit dH<sub>2</sub>O von den Platten gespült und dreimal gewaschen.
- Anschließend wird das Wurmpellet in einem ersten Fixierungsschritt im Reaktionsgefäß für 20 min in 0,8 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,3) behandelt.
- Weiterhin werden die Proben für 1 h auf Eis in einem Mix aus 0,8 % Glutaraldehyd zusammen mit 0,8 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Cacodylatpuffer inkubiert.
- Es folgt viermaliges Waschen für 10 min bei +4 °C in 0,1 M Cacodylatpuffer.
- Fixierung über Nacht bei +4 °C in 2 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Cacodylatpuffer.
- Daraufhin folgt viermaliges Waschen für 10 min bei +4 °C in 0,1 M Cacodylatpuffer.
- Anschließendes Überführen in 2 % Agarose in 0,1 M Cacodylatpuffer für 20 min bei +4 °C.
- Weiterhin werden die Proben in einer aufsteigenden EtOH-Reihe vollständig (bis 100 %) dehydriert. Anschließend folgt eine 100 % Aceton-Inkubation.
- Überführung in Aceton:Araldit 1:1 und 1:2 für je 4 h.

- Die Einbettung erfolgt weiter mit der Überführung in pures Araldit zum Polymerisieren bei +60 °C für weitere 24 h.
- Mit einem Leica Ultra Cut UCT werden von den individuellen Würmern Semidünnschnitte von 0,5 µm angefertigt. Diese Schnitte werden lichtmikroskopisch nach Anfärbung mit Toluidinblau und Azur II-Färbung nach Richardson et al. (1960) untersucht und vorselektiert.
- Anschließend werden Ultradünnschnitte von 60 nm hergestellt.
- Die einzelnen Schnitte werden auf 100 mesh TEM Kupfer Grids überführt und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert, um sie anschließend mit dem Zeiss EM109 Elektronenmikroskop (Carl Zeiss AG, Jena) zu untersuchen.

Die Aufnahmen werden mit der slow-scan CCD Kamera 2K-Wideangle TRS (Tröndle, Moornwies) und mit der Aufnahmesoftware Image SP Professional erzeugt.

#### 2.6.4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ermöglicht es, die äußere Hülle fixierter Würmer stark vergrößert und mit hoher Tiefenschärfe darzustellen. Hierfür wurden zwei verschiedene Ansätze von Würmern verwendet. Es wurden verschieden FP-behandelte *C. elegans* WT Würmer präpariert.

Ansatz A) umfasst Würmer, die sich fünf Tage auf FP 5 ppm oder der Kontrolle entwickelt haben (gestartet mit abgelegten Embryonen). Ansatz B) beinhaltet drei Tage lang inkubierte Würmer (gestartet mit L3-Larven), auf FP 8 ppm und FP 10 ppm oder der unbehandelten Kontrolle. Für REM werden ca. 60 Nematoden für jeden Ansatz verwendet.

- Zunächst werden die Würmer mit dH<sub>2</sub>O von den Platten gewaschen.
- Anschließend folgt die Fixierung in 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) für 2 h bei RT.
- Nach dreimaligem Waschen mit Phosphatpuffer werden die Würmer in 2 % Osmiumtetroxid in Phosphatpuffer für 1 h osmiert.
- Wiederum werden die Proben je dreimal in Phosphatpuffer und dH<sub>2</sub>O gewaschen, bevor sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert werden.

- In 100 % trockenem EtOH konnten die Würmer zur weiteren Verarbeitung zu Steffen Köhler (Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Center for Advanced Imaging) gegeben werden.

Anschließend werden die Proben einer chemischen Trocknung unterzogen und Gold-Argon beschichtet (Sputter Coater, Agar Scientific). Die Auswertung der Proben wurde am Leo 1430 VP (Zeiss) Standardrasterelektronenmikroskop mit 17 kV Beschleunigungsspannung durchgeführt.

## 2.7 Bestimmung des Fettgehalts durch Oil Red O Färbung

Oil Red O färbt neutrale Fette in *C. elegans* und ist auf den gesamten fixierten Wurm anzuwenden (Hench et al. 2011; Yen et al. 2010). Nach dem Waschen der zu untersuchenden Würmer in 1X PBS, folgt die weitere Fixierung für 1 h in der unten aufgeführten Fixierlösung. Anschließend erfolgt dreimaliges Waschen in 1X PBS, um die Würmer danach in 60 % Isopropanol aufzunehmen. Abhängig von der Wurm-Menge wird die Oil Red O Färbelösung je Probe zugegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Zur Ermittlung der Färbeargebnisse werden die Würmer am nächsten Tag mit PBST (0,1 % Tween 20) gewaschen, um sie anschließend auf einem Agarose-Pad zu mikroskopieren (2.6.1).

Zum Zweck der statistischen Auswertung wird die Fettakkumulation in *C. elegans* WT unbehandelt und mit FP-behandelt verglichen und in Fiji analysiert (2.3). Hierzu wird jedes aufgenommene Bild in seine Farbbestandteile zerlegt (RGB). Durch die Oil Red O Anfärbung ist der Rote Kanal von besonderem Interesse. Dieser kann durch Selektion der ROI („Region of interest“) gemessen werden. Für jeden Ansatz wurden mindestens 20 Tiere ausgemessen.

### 2X MRWB "Modified Ruvkun's Witches Brew" (Ruvkun und Finney, 2000)

800 µl 2 M KCl

80 µl 5 M NaCl

2 ml 0,1 M EGTA

1 ml Spermidine HCl

600 µl 0,5 M HEPES

5 ml 100 % MeOH

520 µl dH<sub>2</sub>O



Fixierlösung

1 ml 2X MRWB  
 200 µl 10 % Formaldehyd (Final 1 %)  
 800 µl dH<sub>2</sub>O

Oil Red O Stammlösung

0.5 g Oil Red O Pulver (Sigma-Aldrich)  
 – Gelöst in 100 ml Isopropanol.  
 – Zum Lösen erhitzen (+60 °C).

Färbelösung

Zusammensetzung aus 6 Teilen Oil Red O Stocklösung und 4 Teilen dH<sub>2</sub>O. Nach kräftigem Schütteln wird die Lösung filtriert (0,2 bis 0,4 mm Filter).

1X PBS

8 g NaCl  
 0,2 g KCl  
 1,42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 0,27 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 – Ansatz für 1 l. Einstellung des pH auf 7,4.

## 2.8 EMS Mutagenese Screen

Um ungerichtete Mutationen im Genom von *C. elegans* hervorzurufen, wird die Chemikalie Ethylmethansulfonat (EMS) verwendet. Dabei handelt es sich um ein starkes Mutagen, das unter anderem Mutationen in den Spermien und Oozyten des hermaphroditischen *C. elegans* verursacht. Diese Mutationen sind meist Punktmutationen oder zu einem geringeren Teil kleine Deletionen (Anderson und Brenner, 1984; Brenner, 1974; Dibb et al. 1985). Es ist davon auszugehen, dass EMS mit einer Frequenz von  $5 \times 10^{-4}$  wirkt, was einer Mutation pro 2.000 Genloci pro haploidem Genom von *C. elegans* entspricht (Brenner 1974). *C. elegans* besitzt in etwa 23.000 Gene, sodass in einem genomweiten Screen mehr als 1.000 haploide Genome mutagenisiert werden müssen, damit jeder Lo-

kus mindestens einmal mutagenisiert wird (Jorgensen und Mango, 2002). Eine rezessive, durch Mutagenese eingeführte Mutation, die in einem Hermaphroditen heterozygot vorliegt, wird nach Selbstbefruchtung in der übernächsten Generation (F2) bei einem Viertel der Individuen homozygot vorhanden sein und daher phänotypisch zum Vorschein kommen (Müller und Hassel, 2006). Ein klassischer F2 EMS Mutagenese Screen wurde zum Identifizieren von Genen, die die FP-Resistenz betreffen, durchgeführt.

- Die *C. elegans* WT P0 Generation wird mit EMS (finale Konzentration 47 mM) für 4 h bei RT behandelt (Jorgensen und Mango, 2002).
- Die P0 Tiere werden bei +20 °C gehalten, bis die F1 Generation mit der Ei-Produktion begonnen hat.
- Die F2-Generation wird auf Agarplatten mit *E. coli*/FP als Futterquelle gehalten.
- Mutanten, die in der Lage sind, sich unter FP-Bedingungen zu entwickeln, werden separiert.
- Nach Überprüfung des Phänotyps werden die Mutanten sechsmal gegen den WT mittels *C. elegans* WT Männchen zurückgekreuzt.
- Während der einzelnen Kreuzungsschritte muss der Phänotyp stets im FP-Assay überprüft werden.

## 2.9 Fluopyram-Aufnahme Assays

### 2.9.1 *E. coli* Nahrungsaufnahme (OD<sub>600</sub>) Assay

Die Bestimmung der *E. coli* Nahrungsaufnahme von *C. elegans* unter verschiedenen FP-Bedingungen wurde in einem Flüssigkulturansatz (M9 je 50 ml mit 0,125 ml Carbenicillin und 0,25 ml Nystatin (10.000 U/ml) versetzt) in klaren 48-Well-Platten mit Flachboden (Falcon) mit 500 µl je Well durchgeführt. Jedes Well beinhaltet etwa 10 Würmer in einer frisch angesetzten *E. coli* Suspension (OD<sub>600</sub>=1,5±1,2x10<sup>9</sup> Bakterien/ml) (Gomez-Amaro et al. 2015).

Die optische Dichte jedes Wells bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) wird mit einem Mikroplatten-Reader gemessen. Messungen werden alle 24 h durchgeführt. Zuvor wird die Platte für 25 min geschüttelt. Nach 1-3 Tagen wird jeweils von den Kontroll-Wells ohne Würmer und der Positivkontrolle mit Medium plus Wurmern die optische Dichte gemessen. In jedem Experimentansatz (FP 0, 2, 5 und 10 ppm) stehen je 4 Wells ohne Würmer gegenüber

4 Wells mit Würmern (Aufteilung einer Platte siehe Abbildung 2-1). Zu jeder Platte wird ein Ansatz einer Mutante mit einer Mutation, die sich auf eine verminderte Nahrungsaufnahme ausprägt, hinzugefügt. Die Fressraten werden aus der Differenz der jeweils gegenübergestellten Ansätze ermittelt. Somit wird die Nahrungsaufnahme als die Fressrate der Bakterien-Beseitigung per Well berechnet (Differenz zwischen OD<sub>600</sub> und OD<sub>600</sub> mit Würmern).

### M9 Medium

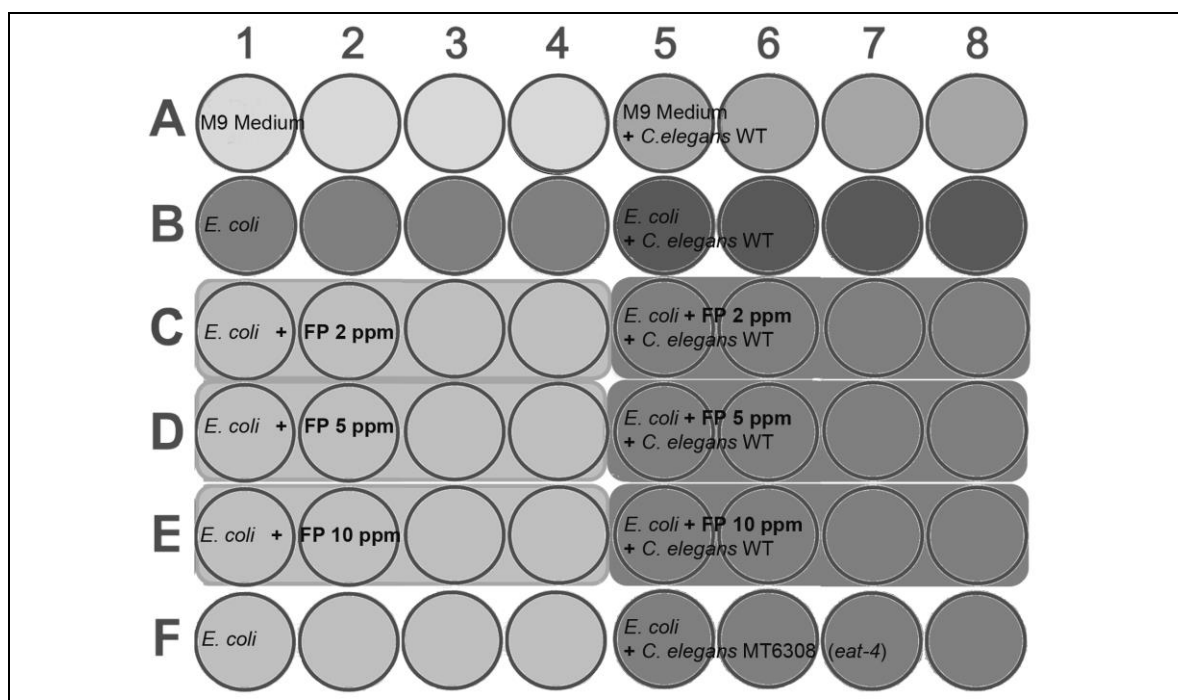
3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

5 g NaCl

– Auffüllen auf 1 l dH<sub>2</sub>O. Nach dem Autoklavieren Zugabe von:

1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>



**Abbildung 2-1 | Aufbau einer 48-Well Platte mit *E. coli* Nahrungsaufnahme (OD<sub>600</sub>) Assay für *C. elegans* mit Fluopyram-Behandlung.**

Die Versuchsansätze wurden je Platte 4-fach angesetzt. Einem Flüssigkulturanatz steht jeweils ein gleicher Ansatz mit zugesetzten Würmern gegenüber. Als Negativkontrolle (Reihe A) wurde ein Ansatz mit M9 Medium + Würmern ohne *E. coli* Bakterien verwendet. Die Positivkontrolle (Reihe B und F) ist in diesem Fall M9 Medium + *E. coli* Bakterien mit und ohne Würmer (*C. elegans* WT oder MT6308). Fluopyram (FP) wurde zum Ansatz zugegeben, jeweils mit und ohne Würmer im Flüssigkulturanatz.

### 2.9.2 Kälte-Assay

Um die Aufnahme eines Wirkstoffs zu ermitteln, wird ein Kälte-Assay durchgeführt. Auf diese Weise kann gezeigt werden, ob ein Stoff um zu wirken den Darmtrakt passieren muss. Hierzu wird eine gemischte Population von Würmern (ca. 50) angesetzt, worauf eine Inkubation bei +4 °C auf Agarplatten erfolgt. Die heruntergekühlten Würmer stoppen die Nahrungsaufnahme und werden reversibel paralysiert (Bernt et al. 1998). Ein Stoff der zu den Bakterien als Futterquelle hinzugegeben wird, könnte entweder durch die Nahrung aufgenommen werden oder als umgebender Stoff in den Wurm diffundieren.

Der Versuchsaufbau beinhaltet Agarplatten - jeweils eine mit *E. coli*/FP 50 ppm und eine Kontrolle ohne FP. Die Inkubation der Platten erfolgt bei +4 °C. Diese werden jeweils nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h Kälte-Inkubation ausgewertet. Nach der jeweiligen Zeit in Kälte werden die Würmer zweimal mit M9 gewaschen und auf neue Platten umgesetzt. Nach der Überführung werden die mobilen Tiere ausgezählt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung des Fluopyram-Assays und Bestimmung der subletalen Konzentration

#### 3.1.1 Entwicklung und Etablierung des FP-Experiments

FP wird in vielen Ländern als ein effektives Fungizid eingesetzt, da es Komplex II der mitochondrialen Elektronentransportkette inhibiert (Sakai et al. 2012; Ishii, Miyamoto, et al. 2011; Sierotzki und Scalliet 2013). Das Fungizid FP wurde bereits bei großangelegten Screens als wirksames Nematizid identifiziert (Burns et al. 2015) und seine Anwendung, als Wirkstoff an Pflanzenparasiten, konnte als ein hocheffektives Molekül bestätigt werden (Faske und Hurd 2015; Vitale et al. 2016).

Das zu etablierende FP-Assay sollte es ermöglichen, die Auswirkungen von FP auf den gesamten Lebenszyklus von *C. elegans* sowohl bei Dauer-, als auch Pulsbehandlung unter dem Binokular und dem Mikroskop zu analysieren. Somit werden die subletalen Effekte vor dem Eintreten der Letalität der FP-Behandlung dokumentiert. Es sollte so die Grundlage für die mögliche Aufklärung der Wirkungsweise von FP in *C. elegans* geschaffen werden.

*C. elegans* lebt unter Laborbedingungen auf Agarplatten mit einem *E. coli* Rasen als Nahrungsquelle. Zur FP-Behandlung wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* (OP50) in LB-Medium mit einer OD<sub>600</sub> von 2,2 mit verschiedenen Konzentrationen (ppm) von FP, gelöst in DMSO (Tabelle 3-1), versetzt und 0,5 ml dieser Lösung flächendeckend auf Petrischalen (60 mm, gefüllt mit 10 ml NGM Agar) aufgebracht. Da geringere Verdünnungen als 50 ppm zum Ausfallen des Wirkstoffes führten, war dies die maximal verwendete FP-Konzentration.

Die mit *E. coli* Bakterien beimpften Agarplatten wurden für mindestens 2 Tage bei Raumtemperatur getrocknet und danach mit *C. elegans* Embryonen, Larven (L1-L4) oder adulten Würmern besetzt (Abbildung 3-1, A). Bei +4 °C gelagert, konnten sie bis zu einer Woche verwendet werden. Sämtliche FP-Experimente wurden bei +20 °C durchgeführt (falls nicht anders erwähnt). Die DMSO-Konzentrationen ( $\leq 0,1$  %) waren zu vernachlässigen, da

die Entwicklung von *C. elegans* bis zu einer Konzentration von 1 % DMSO normal verläuft (Bernt et al. 1998).

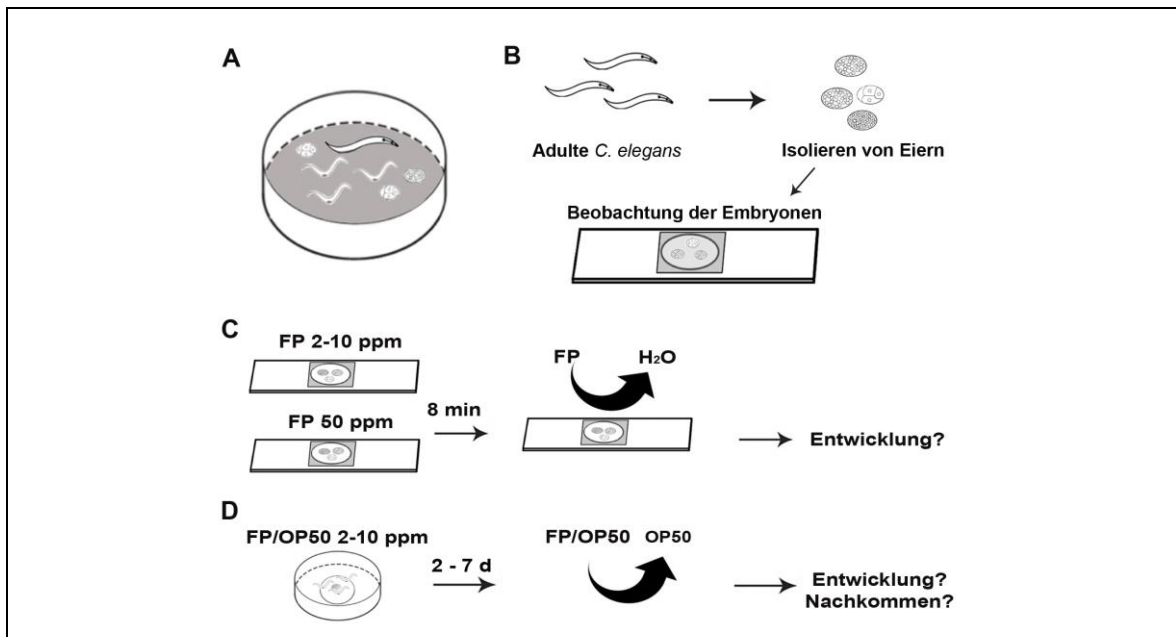
Tabelle 3-1 | Verwendete Konzentrationen von Fluopyram (MW 396,7 g/mol) ausgehend von einer 50.000 ppm Stammlösung.

ppm=mg/l	μM	Verdünnung
<b>0,16</b>	0,4	1:312.500
<b>1</b>	2,5	1:50.000
<b>2</b>	5	1:25.000
<b>5</b>	12,5	1:10.000
<b>8</b>	20	1:6.250
<b>10</b>	25	1:5.000
<b>50</b>	125	1:1.000

Für die mikroskopische Analyse der Embryonalentwicklung von *C. elegans* unter dauerhaftem FP-Einfluss wurden Embryonen aus adulten Tieren (gehalten auf FP-freien Agarplatten) isoliert und entweder auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger oder Objektträger mit einem Agarose-Pad aufgebracht (2.6.2.1). Anschließend wurden die Embryonen mit einer FP-Lösung, verdünnt in Wasser (Tabelle 3-1), inkubiert. Das Deckglas wurde mit Vaseline versiegelt, um ein Verdampfen des Wassers und eine daraus resultierende Veränderung der FP-Konzentration zu verhindern (Abbildung 3-1, B).

Bei einer Pulsbehandlung mit FP wurde das mikroskopische Präparat lediglich an zwei Seiten versiegelt. Die FP-Lösung wurde dann nach einer definierten Inkubationszeit mit Wasser ersetzt. Um das FP vollständig zu entfernen, wurde mehrfach mit Wasser gespült (Abbildung 3-1, C). Die Pulsbehandlung von *C. elegans* Larven und Adulten wurde mit FP auf Agarplatten durchgeführt. Nach der jeweiligen Inkubationsdauer wurden die Tiere zur weiteren Beobachtung auf FP-freie Platten transferiert (Abbildung 3-1, C).

Untersuchungen zur Wirkungsweise von Nematiziden, welche die Wirkstoffaufnahme eines Wurmes im Hinblick auf die Endkonzentration im Wurm untersuchten, zeigten die höchsten Wirkstoffkonzentrationen im Wurm bei der Verwendung toter *E. coli* Bakterien auf Agarplatten oder im Flüssigkulturansatz (Zheng et al. 2013).



**Abbildung 3-1 | Schematische Darstellung des Fluopyram-Assays auf Agarplatten und Objektträgern bei permanenter Behandlung und Pulsexperimenten.**

**A)** Adulte Würmer, Larven und Embryonen werden auf Agarplatten, die komplett mit *E. coli* als Futterquelle bedeckt sind und FP in verschiedenen Konzentrationen enthalten kultiviert (Tabelle 3-1). **B)** Die Entwicklung von Embryonen (Proliferations- und Morphogenesestadien) wird nach Erhalt aus adulten Wütern bei verschiedenen FP-Konzentrationen auf einem Objektträger (Poly-L-Lysin oder Agarosepad) unter dem Mikroskop analysiert (siehe 2.6.1). **C-D)** Experimente zur Pulsbehandlung von *C. elegans* Embryonen, Larven und Adulten auf Objektträgern bzw. Agarplatten mit FP von *C. elegans* wurden während der Embryogenese auf dem Objektträger unter dem Mikroskop durchgeführt. **C)** Dabei ist das Deckglas nicht komplett verschlossen, um einen Austausch der FP-Lösung mit Wasser zu ermöglichen. **D)** Würmer von FP-haltigen Agarplatten (2-7 Tage) werden auf neue Platten durch Spülen oder mit Hilfe eines Platindrahts auf FP-freie Agarplatten überführt.

Zur Überprüfung des Einflusses dieser Faktoren auf das verwendete FP-Assay auf NGM Agarplatten mit FP versetzten lebenden *E. coli* Kulturen (3.1) wurden die Zusammensetzung der Agarplatten sowie die Verwendung von toten und lebenden *E. coli* Kulturen hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf unbehandelte Tiere überprüft. Die Verwendung salzfreier Agarplatten führte im Vergleich zu NGM Agarplatten zu 50 % weniger Nachkommen. Eine Fütterung von toten *E. coli* Bakterien resultierte in 20 % weniger Nachkommen im Vergleich zur Fütterung von lebenden Bakterien (Daten nicht gezeigt). Die Veränderung der Kulturbedingungen erschweren einen Vergleich mit bestehender Literatur, die eine durchschnittliche Nachkommenzahl von *C. elegans* unter Laborbedingungen von 200-300 pro Wurm angibt (Bernt et al. 1998). Die Kultivierung auf NGM Agarplatten, bedeckt mit lebenden *E. coli* als Futterquelle, resultiert in den beschriebenen, durchschnittlichen Ergebnissen der Nachkommenzahl und wurde daher im Folgenden verwendet.

### 3.1.2 Verwendung des FP-Assays zur Bestimmung der subletalen Konzentration für *C. elegans*

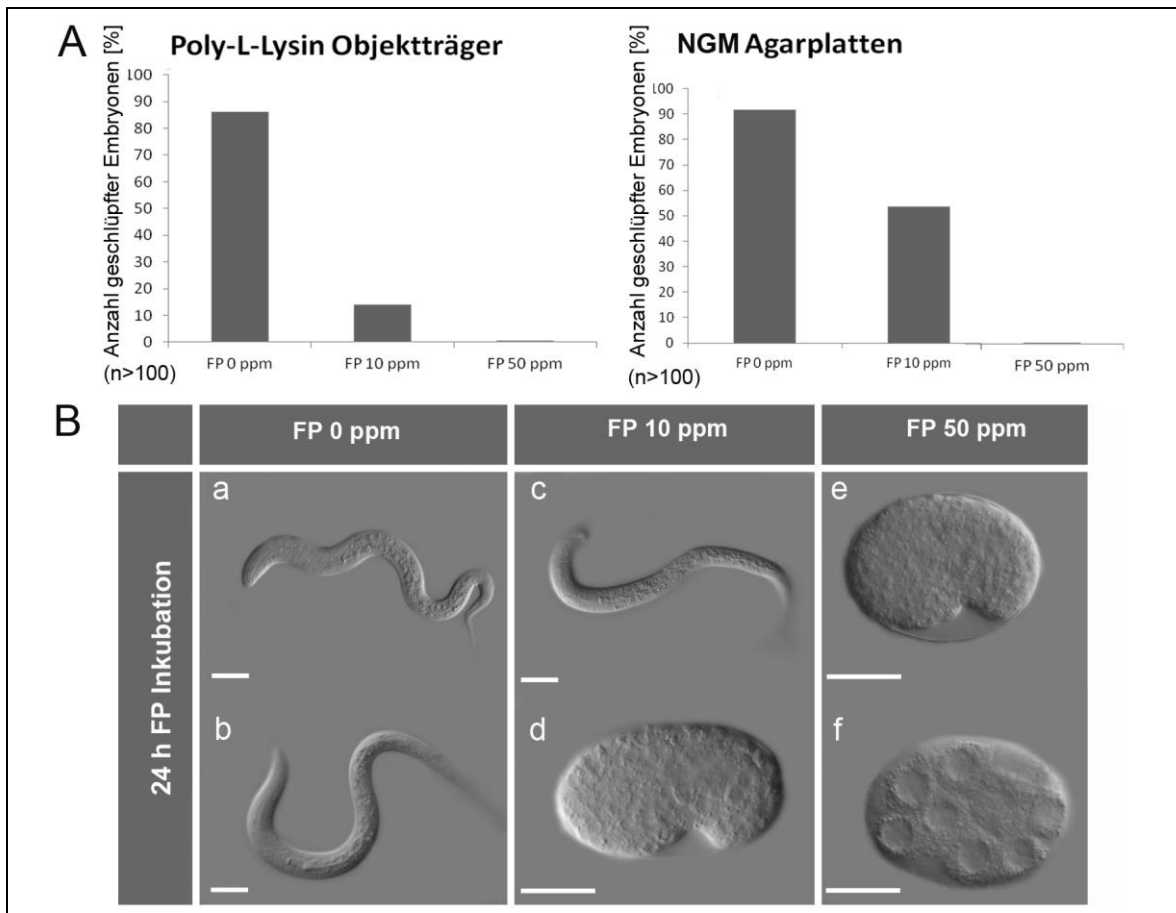
Nach Etablierung der Kulturbedingungen im FP-Assay (3.1.1) wurden die subletalen Konzentrationen von FP in *C. elegans* WT bestimmt. Die Analyse der Embryogenese unter dauerhaftem FP-Einfluss wurde an Embryonen auf Objektträgern, angehaftet auf Poly-L-Lysin, sowie auf Agarplatten beobachtet. Der *C. elegans* WT durchläuft während seiner Embryonalentwicklung charakteristische Stadien (Gastrulation, Bohne, Komma, Pflaume, Kaulquappe, Brezel und Schlinge (Schierenberg 1987)) bis hin zur Larve, die in der Lage ist, aus der Eihülle zu schlüpfen (Abbildung 1-2).

Unter Kontrollbedingungen (FP 0 ppm) schlüpften sowohl auf Objektträgern als auch auf Agarplatten 90 % der Embryonen (Abbildung 3-2, A-B). Bei einer Konzentration von FP 10 ppm konnten nur 15 % der Embryonen auf Objektträgern und 50 % der Embryonen auf Agarplatten schlüpfen (Abbildung 3-2, A, B a-c). Bei FP 50 ppm konnten weder auf dem Objektträger noch auf der Agarplatte geschlüpfte Embryonen dokumentiert werden (Abbildung 3-2, A). Auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern konnte der Zeitpunkt des Arrests genauer bestimmt werden. Während die Embryonen bei FP 10 ppm eine Entwicklung bis zur Morphogenese durchliefen und erst dann arretierten, zeigte sich bei FP 50 ppm ein sofortiger Arrest nach FP-Zugabe (Abbildung 3-2, B d-f).

Der Unterschied zwischen Objektträgern und Agarplatten könnte durch den direkten Kontakt der FP-Verdünnung mit dem gesamten Embryo auf dem Objektträger im Vergleich zur aufgetragenen FP-Suspension auf die Agarplatte erklärt werden.

Im Kontrollansatz schlüpften unter beiden Bedingungen ca. 90 % der Embryonen. Unter Berücksichtigung von Einflüssen durch die Präparation, die sich sowohl auf die Kontroll- als auch die FP-Behandlung auswirkte, ist diese Abweichung jedoch zu vernachlässigen.





**Abbildung 3-2 | 24 h Inkubation von *C. elegans* Embryonen bei verschiedenen Fluopyram-Konzentrationen auf Objektträgern und Agarplatten mit Darstellung des Phänotyps.**

**A)** Anzahl der geschlüpften Embryonen in % [n>100, je Konzentration]. **B)** DIK-Optik geschlüpfter Larven (**a-c**) und arretierter Embryonen (**d-f**). Eichstriche 20 µm.

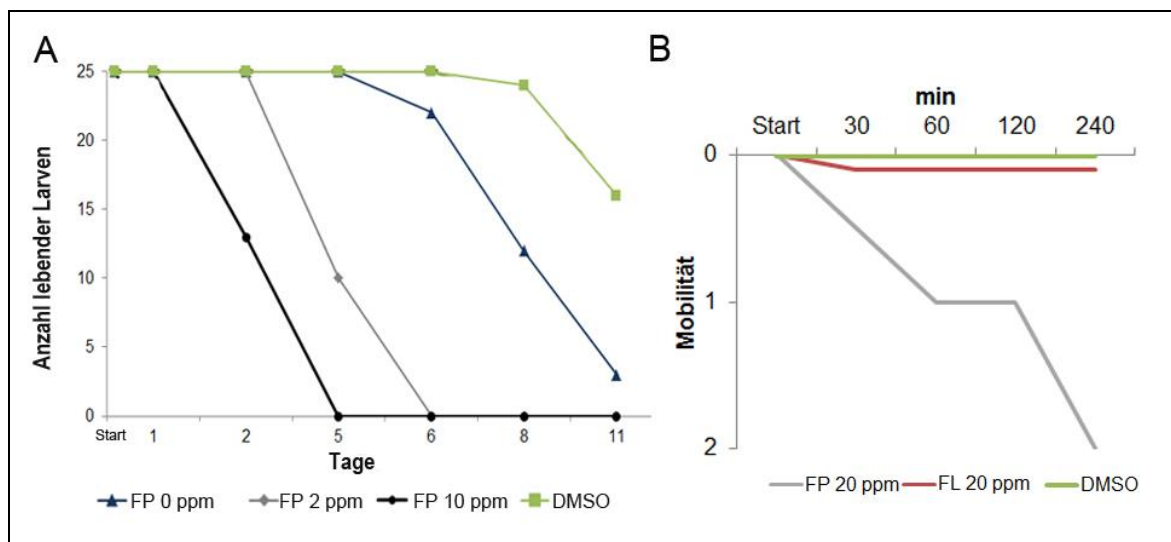
In bisher beschriebenen Assays, die potenzielle Nematizide an *C. elegans* untersuchten, wurden die Effekte eines Wirkstoffes zumeist im Flüssigkulturansatz überprüft. In einem solchen Flüssigkulturansatz konnte gezeigt werden, dass FP bei Untersuchungen an Larven als Nematizid eine inhibitorische Konzentration von  $IC_{50}=1,8 \text{ nM}$  (0,16 ppm) hat (Burns et al. 2015).

Um zusätzlich zu den entwickelten Kulturbedingungen im FP-Assay (3.1.1) die Auswirkung von FP in Flüssigkultur zu überprüfen, wurde FP verdünnt in M9 Medium auf Larven angewendet. Die Untersuchungen wurden bei FP-Konzentrationen von 0,16; 2 und 10 ppm in 6-Well Platten durchgeführt. In einem Flüssigkulturansatz entsprach die DMSO-Konzentration der Kontrollansätze dem jeweiligen Gehalt an DMSO der höchsten verwendeten FP-Suspension. Die FP-Behandlung bei 2 und 10 ppm führte nach 5 bzw. 3 Tagen in der Flüssigkultur zur Letalität der Larven (Abbildung 3-3, A). Letalität wurde durch

Klopfen der 6-Well Platten und eine fehlende Bewegungsreaktion der Larven darauf ausgemacht. Währenddessen zeigten die bei 0,16 ppm kultivierten Larven und die der DMSO Kontrolle (0,125 % DMSO) erst nach 8 bzw. 11 Tagen eine 50%ige Letalität (Abbildung 3-3, A). Somit konnte der Effekt von FP zusätzlich zum FP-Assay (3.1.1) auch in Flüssigkultur gezeigt werden.

Um die Geschwindigkeit der einsetzenden FP-Wirkung bzgl. der Mobilität zu untersuchen, wurde ein nach Bernt et al. (1998) beschriebener Ansatz durchgeführt. M9 Medium Flüssigkulturansätze mit einer FP-Konzentration von 20 ppm wurden mit dem bekannten Succinat-Dehydrogenase-Inhibitor Flutolanil (FL) und einer DMSO Kontrolle verglichen. Im Gegensatz zu der 0,25 % DMSO Kontrolle und dem Inhibitor Flutolanil führte nur die Inkubation mit FP innerhalb kurzer Zeit (240 min) zur Paralyse (Nicht-Bewegung nach Klopfen der Kulturplatte) behandelter Würmer (Abbildung 3-3, B).

Die Wirkung von FP als Nematizid durch Letalität und Paralyse in Flüssigkulturansätzen konnte gezeigt und bestätigt werden. Unterschiede zwischen den Bedingungen auf Agarplatten (FP-Assay) und einem Flüssigkulturansatz konnten nur in Abhängigkeit der Konzentration, nicht aber in der Wirkung von FP auf *C. elegans* gezeigt werden.



**Abbildung 3-3 | Überlebensrate und Mobilität von L1-Larven bei Fluopyram-Behandlung in Flüssigkultur (M9 Medium, 48-Well Platte).**

**A)** Darstellung der Anzahl lebender L1-Larven (Start n=25, je Konzentration) nach 1-11 Tagen FP-Inkubation und DMSO-Inkubation als Kontrolle. Eine Larve wurde als lebendig eingestuft, wenn sich die Larve nach Klopfen der Kulturplatte bewegte. **B)** Darstellung der Mobilität von L1-Larven innerhalb eines Zeitraums von 240 min bei FP-Inkubation sowie Flutolanil- und DMSO-Inkubation (rot und grün) als Kontrollen. Mobilitätsparameter: 0 normale Bewegung, 1 verzögerte Bewegung und Reduktion der Geschwindigkeit (nach Klopfen der Platte) und 2 Paralyse=keine Bewegung oder Reaktion nach Klopfen der Kulturplatte.

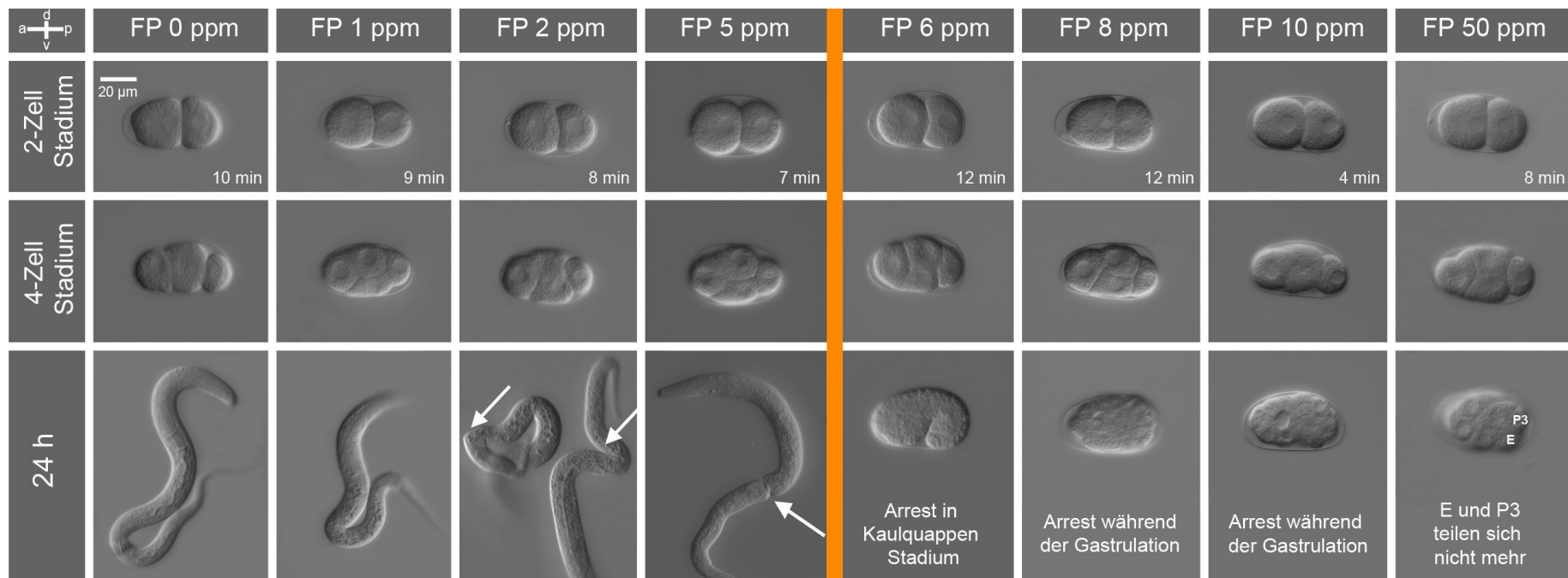
## 3.2 Kritische Fluopyram-Konzentrationen bezüglich des *C. elegans* Lebenszyklus

### 3.2.1 Permanente FP-Behandlung von *C. elegans* Embryonen und Larven: Ermittlung der kritischen Konzentration

Mit Hilfe des etablierten FP-Assays (3.1) konnten Embryonen und Larven in steigenden Konzentrationen von FP behandelt werden. Durch mikroskopische Analyse der Embryogenese unter dauerhaftem FP-Einfluss konnte eine kritische Konzentration im flüssigen FP-Ansatz auf Objektträgern zwischen 5 und 6 ppm (Abbildung 3-4) ermittelt werden. Bis zu einer FP-Konzentration von 5 ppm entwickelten sich Embryonen zu schlüpfenden L1-Larven. Steigende FP-Konzentrationen (2 und 5 ppm) führen zunächst zu Kutikula-Defekten (Knicke) (Abbildung 3-4, Pfeile). Konzentrationen  $\geq 6$  ppm führten zum embryonalen Arrest, wobei höhere FP-Konzentrationen (8, 10 und 50 ppm) zu einem früheren Arrest des Embryos führten (Abbildung 3-4). Während eine Konzentration von 6 ppm die Entwicklung bis zur Morphogenese erlaubte, resultierte die FP-Behandlung von 50 ppm in einem Arrest noch vor der Gastrulation (Abbildung 3-4).

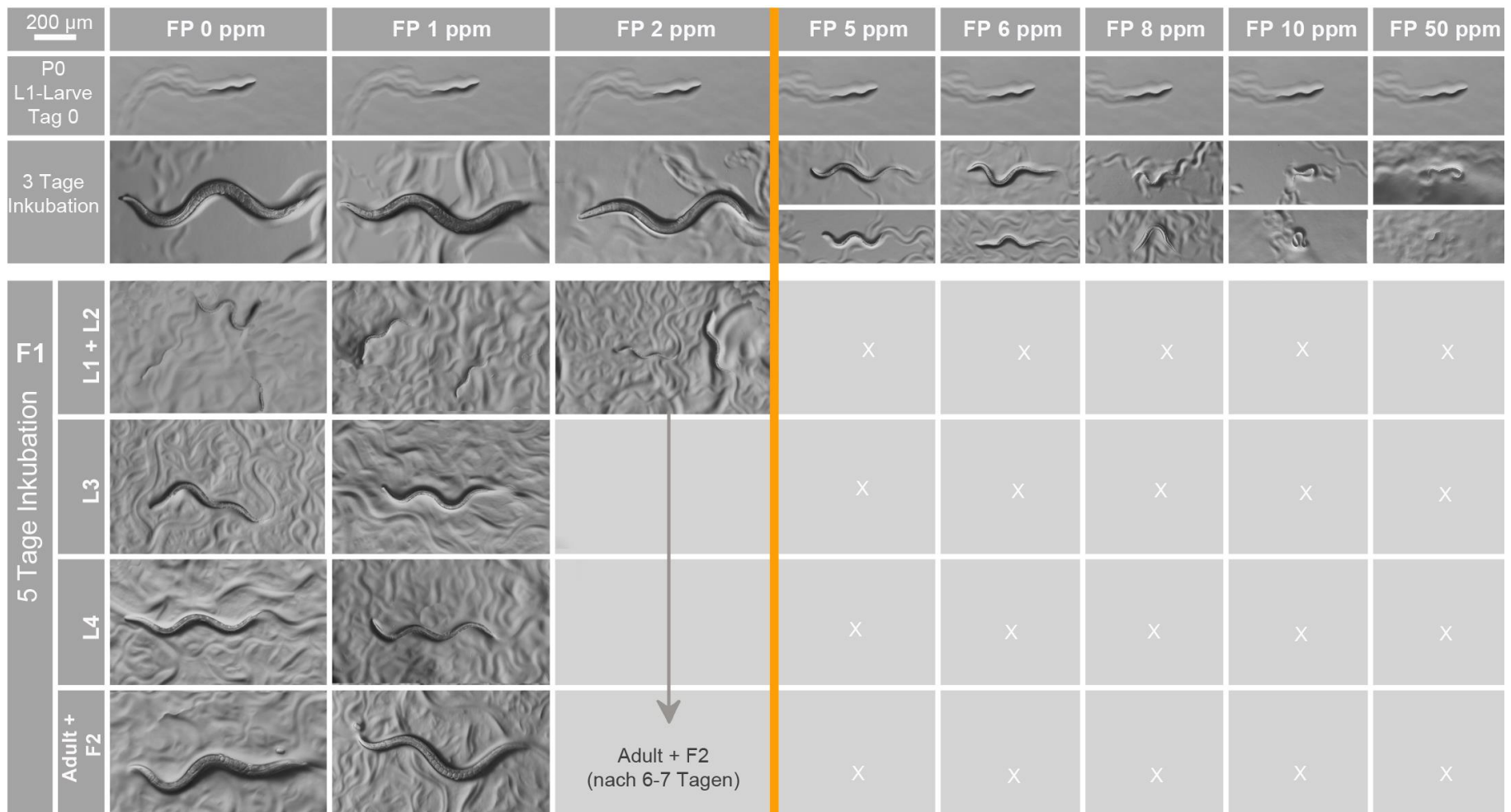
Um die kritische FP-Konzentration für L1-Larven zu untersuchen, wurden L1-Larven auf Agarplatten inkubiert. Die FP-Konzentration, die eine normale larvale Entwicklung und eine Entwicklung zu einem fertilen Adulten ermöglicht, liegt bei  $\leq 2$  ppm (Abbildung 3-5 und Daten nicht gezeigt). Bei FP-Konzentrationen  $\geq 5$  ppm arretierte die Entwicklung konzentrationsabhängig im L1/L2-Larvenstadium (Abbildung 3-5).

Für Embryonen und Larven wird fortan FP 2 ppm als subletal beschrieben. Bei dieser Konzentration ist die Entwicklung von *C. elegans* zwar verlangsamt, dennoch können sich sowohl FP-behandelte Embryonen zu schlüpfenden Larven entwickeln als auch Larven zu fertilen Adulten. Zudem ist es möglich, Würmer dauerhaft auf FP 2 ppm zu halten (bis zur 8. Generation, Daten nicht gezeigt). Demgegenüber wird FP 10 ppm nachfolgend als letale Konzentration definiert, die sowohl die larvale als auch die embryonale Entwicklung (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-9) inhibiert. Außerdem konnte die fehlende Ausbildung einer Gonade sowie die Ausbildung einer hervorstehenden Vulva in FP-behandelten Adulten beobachtet werden (Abbildung A-1).



**Abbildung 3-4 | Entwicklung von *C. elegans* Embryonen auf Objektträgern mit Agarose mit steigenden Fluopyram-Konzentrationen (0-50 ppm) in einem Zeitraum von 24 h.**

Jede Spalte zeigt die Entwicklung desselben Embryos. **Reihe 1)** 2-Zell-Stadien; Zeit seit Start der FP-Inkubation ist in min angegeben. **Reihe 2)** 4-Zell-Stadium. **Reihe 3)** terminaler Phänotyp nach 24 h. Es sind Knicke in der Kutikula geschlüpfter Larven nach FP 2 und 5 ppm Behandlung zu identifizieren (Pfeile). Eine FP-Konzentration von 6 ppm führte während der Embryogenese zum Arrest in einem Morphogenese-Stadium. Die FP-Behandlung von FP 8 und 10 ppm ließ die Embryogenese während der Gastrulation arretieren. Bei der höchsten FP-Konzentration von 50 ppm arretierte die Entwicklung vor der beginnenden Gastrulation, da sich die E- und P3-Zelle nicht mehr teilen (somatische Gründerzellen: E und P3 zur Veranschaulichung der Einwanderung der E-Zellen während der Gastrulation markiert). Die orange Markierung verdeutlicht die kritische Konzentration zwischen FP 5 und 6 ppm, bei der die Embryonen nicht mehr in der Lage waren zu schlüpfen. Embryonen sind orientiert mit anterior links, posterior rechts. DIK-Optik, Eichstrich 20 µm, Aufnahmen Dr. Julia Camps.



**Abbildung 3-5 | Permanente Fluopyram-Inkubation von *C. elegans* auf Agarplatten.**

**Reihe 1)** Start der FP-Inkubation von L1-Larven (P0-Generation) bei verschiedenen FP-Konzentrationen in ppm. **Reihe 2)** Entwicklungsstadien nach 3 Tagen FP-Inkubation. 0-2 ppm fertile Adulte der P0-Generation; 5–50 ppm arretierte Larvenstadien der P0-Generation. **Reihe 3)** Weitere Inkubationen der F1-Generation (P0, FP 0-2 ppm). **Reihe 4–6)** Weitere Entwicklung der F1-Generation zu fertilen Adulten mit F2-Generation nach 5 Tagen im Falle von 0-1 ppm. Ein ‚X‘ indiziert das Fehlen der F1-Generation. Die orange Markierung verdeutlicht die kritische Konzentration zwischen FP 2 und 5 ppm, bei der sich keine F1-Generation unter permanenter FP-Behandlung entwickelte. Binokular-Optik, Eichstrich 200 µm, Aufnahmen Dr. Julia Camps.

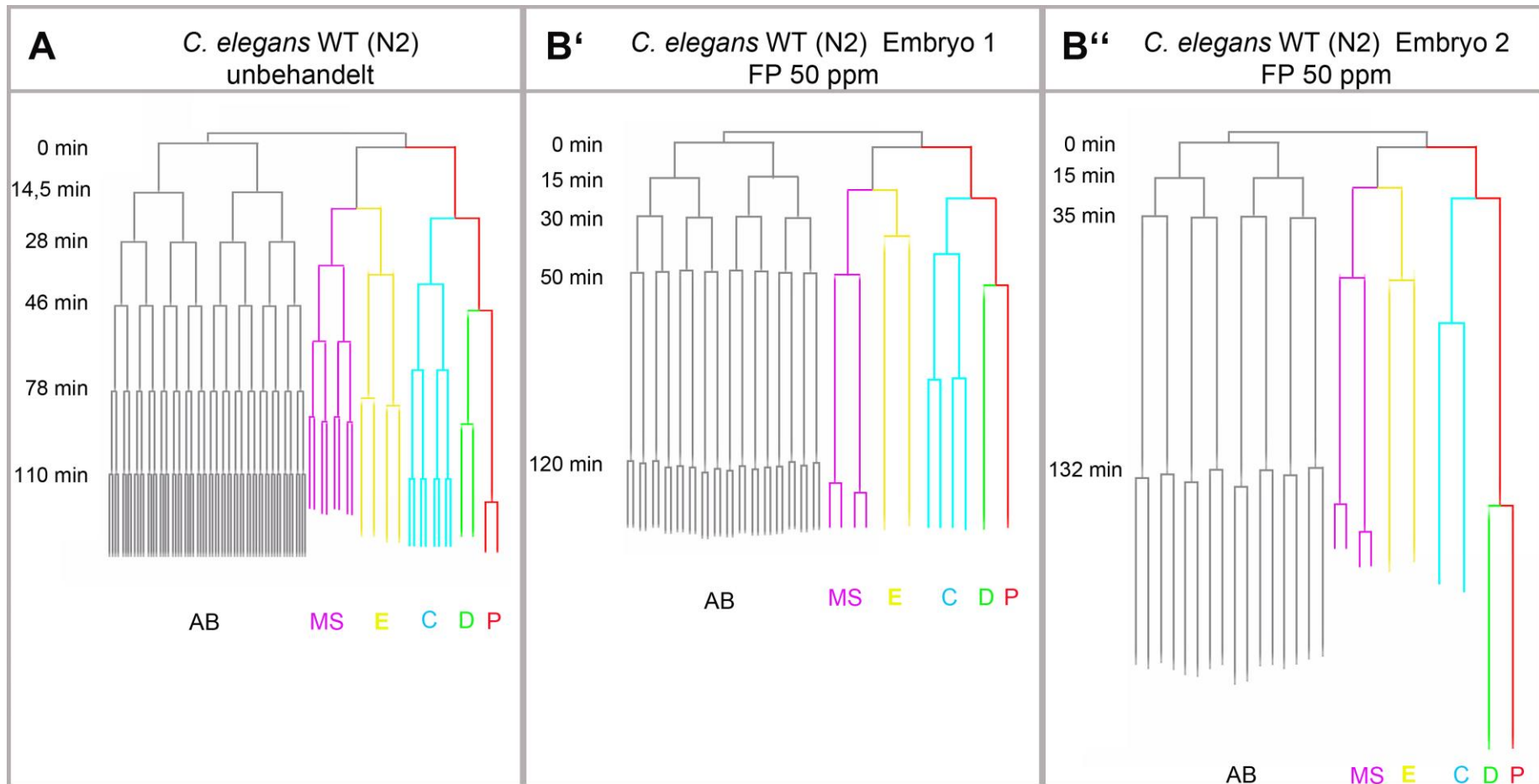
### 3.2.2 Analyse der Zellteilungsprozesse von *C. elegans* Embryonen unter FP-Behandlung

Die Behandlung mit FP führte zu einem konzentrationsabhängigen Arrest der Embryogenese von *C. elegans* WT. FP 6 ppm führte bei dauerhafter Inkubation zum Arrest in der Morphogenese, wogegen Konzentrationen zwischen 8 und 10 ppm zu einem Arrest während der Gastrulation führten (3.2.1). FP 50 ppm resultierte in einem frühen Arrest in der Embryogenese, bereits vor Beginn der Gastrulation (Abbildung 3-4).

Um den Grund des Arrests in der Embryogenese zu analysieren, wurden 4-D-mikroskopische Aufnahmen von Embryonen unter FP-Behandlung ausgewertet. Es wurde untersucht, ob Abweichungen in der Zellteilungsabfolge der normalerweise invarianten Zellteilungsmuster von *C. elegans* auftreten. Mögliche Fehler im Ablauf der Zellteilungen sollten so aufgedeckt werden. Beginnend mit der Zygote, die sich asymmetrisch in eine somatische AB und eine Keimbahnvorläuferzelle P1 teilt, kann der Ablauf der Embryogenese in drei räumlichen Dimensionen über die Zeit als vierte Dimension beobachtet werden.

4-D-Video-Mikroskopie Analysen an Embryonen mit einer FP-Behandlung von 50 ppm demonstrierten eine Verlangsamung des Zellzyklus in allen Gründerzellen (Abbildung 3-6, B' und B''). Es konnten keine Hinweise auf Defekte in den asymmetrischen Zellteilungen, die zur Ausbildung der somatischen Gründerzellen und der primordialen Keimbahn führen, beobachtet werden (Abbildung 3-6, B' und B''). Obwohl der Zellzyklus durch FP verlangsamt wurde, war die Abfolge der einzelnen Zellteilungen korrekt.

Die 4-D-Analyse konnte zeigen, dass die Behandlung mit FP 50 ppm zunächst zu einer Verlangsamung der Zellteilungen und letztlich zu einem Ausbleiben derselben und somit zu einem Arrest der Embryogenese führte. Eine Verlangsamung des Zellzyklus durch FP ohne Defekte in der Abfolge der frühen Teilungen sowie der Entstehung der Gründerzellen, könnte auf eine fehlende Energiequelle hinweisen, die für die Zellteilungen in der *C. elegans* WT Embryogenese essentiell ist (Oka und Futai, 2000). Der *C. elegans* WT benötigt für die aufwendigen Zellteilungen ATP, das durch die Wirkung von FP auf Komplex II der Elektronentransportkette möglicherweise nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung steht.



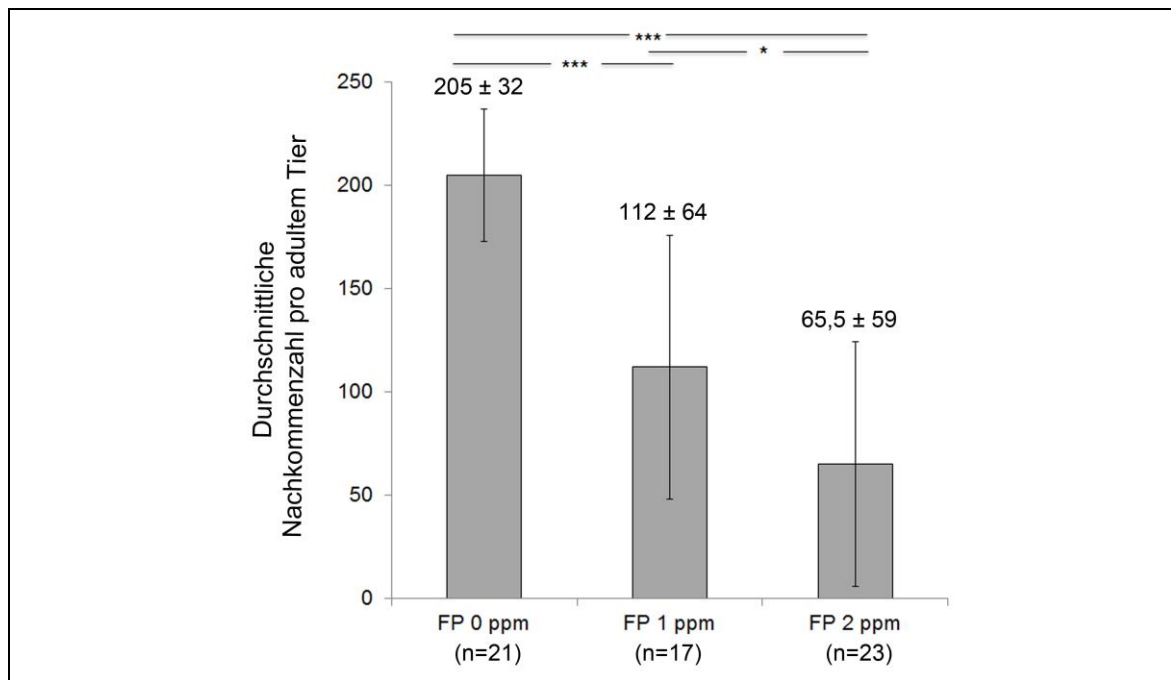
**Abbildung 3-6 | 4-D-mikroskopische Analyse der Embryogenese des *C. elegans* WT unter Fluopyram-Behandlung.**

**A)** Darstellung des Zellteilungsablaufes eines sich teilenden *C. elegans* WT Embryos unter Kontrollbedingungen (FP 0 ppm). **B–B')** Gegenüberstellung der Zellgenealogie von FP-behandelten *C. elegans* WT. **B')** und **B'')** Zwei unterschiedliche mit FP 50 ppm behandelte *C. elegans* WT Embryonen. Deren Zellteilungen verlangsamten sich im Vergleich zu A und stoppten dann gänzlich (letzte Teilungen nach 120 bzw. 132 min). Untersucht wurden die Embryonen jeweils ab einem 2-Zell-Stadium. Die Aufteilung einer Linie im Diagramm weist auf eine Teilung der einzelnen Zelllinien hin (jeweils mit Zeitangabe links der Teilung ab dem 2-Zell-Stadium). Folgende Zelllinien sind farblich unterschiedlich gekennzeichnet und wurden über die Zeit verfolgt. AB (grau): Hautmuskelschlauch, Pharynx und Nervenzellen - MS (pink): Pharynx, Muskeln, Drüsen und Nervenzellen - E (gelb): Entoderm - C (blau): Hautmuskelschlauch, Muskeln und zwei Nervenzellen - D (grün): Muskeln - P (rot): Keimzellen.

### 3.2.3 Permanente FP-Behandlung reduziert die Nachkommenzahl und arretiert die Entwicklung der Larvenstadien von *C. elegans*

Der Arrest in der postembryonalen Entwicklung, der durch die FP-Behandlung hervorgerufen wurde, definiert eine kritische FP-Konzentration von  $\geq 3$  ppm (3.2.1). Fertile Adulte waren bei einer permanenten FP-Behandlung ausschließlich bei Konzentrationen bis 2 ppm auf Agarplatten zu beobachten. Embryonen, die sich unter permanenter FP-Behandlung in den Konzentrationen von 1 und 2 ppm zu Adulten entwickelten, haben signifikant weniger Nachkommen als unbehandelte Würmer (Abbildung 3-7). So ist die Anzahl der Nachkommen gegenüber 205 (in der Kontrolle) bei einer FP-Behandlung von 1 ppm auf 112 ( $t(36)=5,27$ ;  $p<0,001$ ) und bei 2 ppm auf 65 reduziert ( $t(42)=8,73$ ;  $p<0,001$ ).

Da eine permanente FP-Behandlung ebenfalls zu einer fehlerhaften Ausbildung der Vulva führte, muss auch dies als potenzielle Beeinflussung der Reproduktion unter FP-Behandlung berücksichtigt werden (Abbildung A-1). Permanent FP-behandelte Larven entwickeln defekte Gonaden und sind somit nicht in der Lage Nachkommen zu produzieren (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3-7 | Anzahl der Nachkommen adulter *C. elegans* bei permanenter Fluopyram-Behandlung auf Agarplatten.**

Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) der Nachkommen über einen Ablagezeitraum von 2 Tagen bei verschiedenen FP-Konzentrationen (0–2 ppm). Die adulten Tiere entwickelten sich ab ihrer Embryogenese (Start mit abgelegten Embryonen) auf FP-Agarplatten.

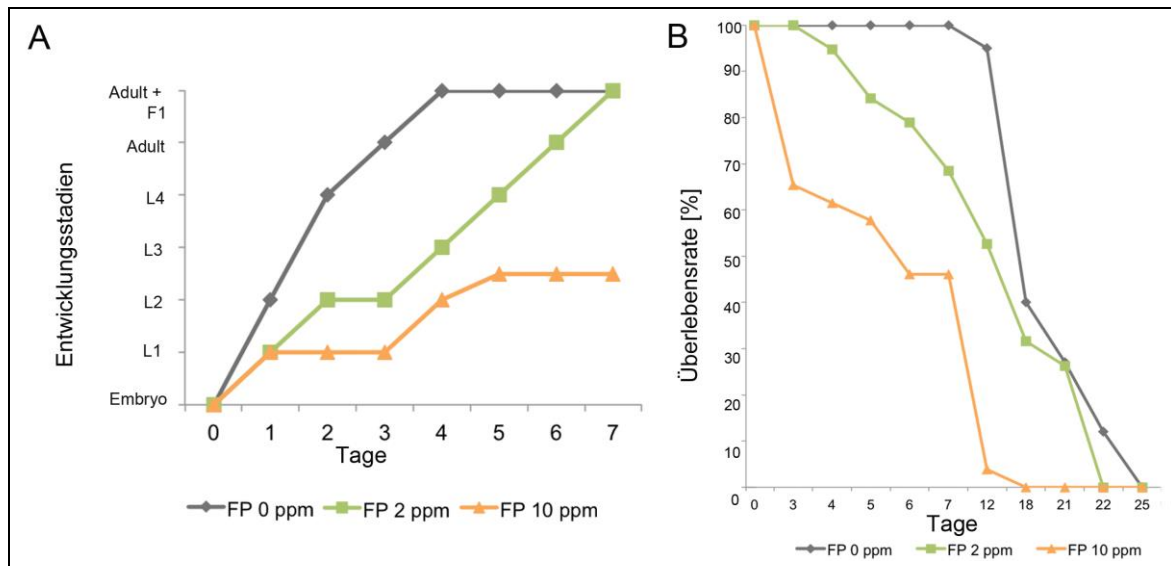


Da gezeigt werden konnte, dass sich die FP-Behandlung auf den Lebenszyklus von *C. elegans* durch Arrest der embryonalen und larvalen Entwicklung sowie der geringeren Nachkommenzahl von Adulten auswirkt, sollten im Folgenden Veränderungen auf die Lebensspanne und die Entwicklung von *C. elegans* untersucht werden.

Der *C. elegans* WT eignet sich aufgrund der vergleichsweise kurzen Lebensdauer ideal zur Bestimmung der Lebensspanne. Unter WT Bedingungen dauert die Entwicklung von *C. elegans* vom Ei zum fertilen Adulten 3 Tage (Abbildung 1-3). Die FP-Behandlung wirkte sich auf die Entwicklung bei 2 ppm verlangsamernd (7 Tage bis zum fertilen Adulten) und bei 10 ppm arretierend, in einem Larvenstadium zwischen L2 und L3, aus (Abbildung 3-8, A).

Die Beobachtung der Lebensspanne von *C. elegans* beginnt mit der Eiablage und endet mit dem Eintreten der Letalität. Dabei ist die mittlere Lebensspanne durch die Anzahl der Tage definiert, an der 50 % der behandelten Population lebendig ist. Bei *C. elegans* beträgt die mittlere Lebensspanne 18 Tage und die maximale Lebensdauer 25 Tage (Abbildung 3-8, B). Durch die FP-Behandlung wurde die maximale und mittlere Lebensspanne von *C. elegans* auf Agarplatten, wie nachfolgend beschrieben, verringert (Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9):

Permanent FP-behandelte Tiere auf Agarplatten zeigen eine konzentrationsabhängige verkürzte Lebensspanne. Bei einer FP-Behandlung von 2 ppm beträgt die maximale Lebensdauer 23 Tage. Jedoch ist die FP-Behandlung bei 50 % (mittlere Lebensspanne) der FP 2 ppm behandelten Würmer nach 12 Tagen letal (Abbildung 3-8, B). Die Behandlung in einer letalen Dosis, FP 10 ppm, führt zu einer maximalen Lebensspanne von 18 Tagen, wobei es sich hierbei um arretierte L2/L3-Larven handelt. Die mittlere Lebensspanne liegt bei etwa 5 Tagen.

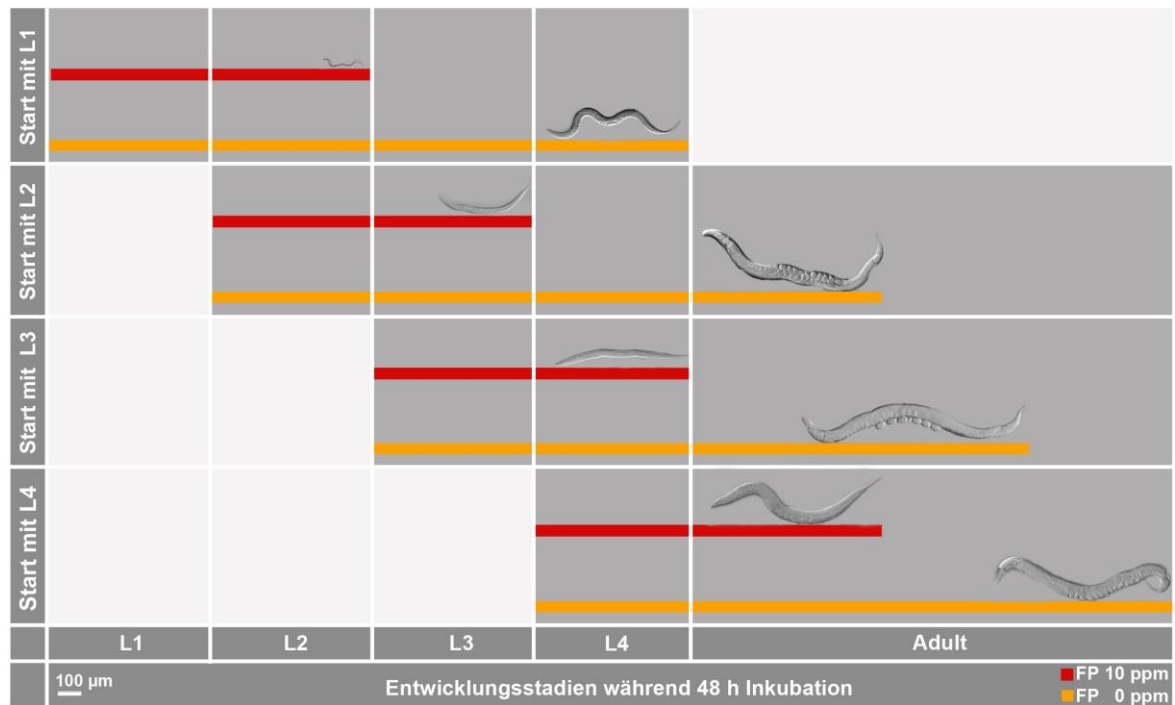


**Abbildung 3-8 | Entwicklung von Embryonen und Lebensspanne auf Agarplatten bei permanenter Fluopyram-Behandlung.**

**A)** Die Analyse der Entwicklung (gestartet mit Embryonen,  $n=11$  jeweils) auf FP (0, 2 und 10 ppm) Agarplatten wurde gegen die jeweiligen Entwicklungsstadien aufgetragen. Während sich die unbehandelten Embryonen innerhalb von drei Tagen zum Adulten entwickelten, arretierten FP 10 ppm behandelte Embryonen im frühen Larvenstadium (L2–L3). **B)** Dargestellt ist die Lebensspanne von Embryonen ( $n=25$ , jeweils), abgelegt auf Agarplatten, die permanent auf FP 2 und 10 ppm Agarplatten im Vergleich zu Kontrollbedingungen ohne FP (0 ppm) behandelt wurden. Festlegung der Letalität der Population durch fehlende Reaktion auf mechanischen Reiz.

Wird die FP-Behandlung bei 10 ppm mit verschiedenen Larvenstadien (L1–L4) gestartet, ist die Entwicklung, unabhängig vom inkubierten Larvenstadium, verlangsamt (Abbildung 3-9). Während die unbehandelten Larven innerhalb von 48 h vier Larvenstadien durchlaufen, vollzogen FP 10 ppm behandelte Larven lediglich eine Häutung. Eine L2-Larve entwickelte sich beispielsweise innerhalb von 48 h unter FP 10 ppm zu einer L3-Larve und unter Kontrollbedingungen zu einem fertilen Adulten (Abbildung 3-9).

Analysen der Auswirkungen von FP auf die embryonale und larvale Entwicklung durch Beobachtung auf Agarplatten (FP-Assay) und die 4-D-Mikroskopie Analyse konnten zeigen, dass FP konzentrationsabhängig auf die Entwicklung von *C. elegans* wirkt, indem es diese verlangsamt bzw. zu einem vollständigen Arrest führt.



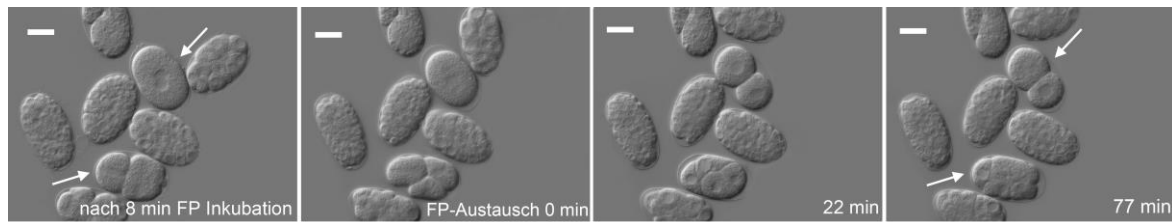
**Abbildung 3-9 | Entwicklung verschiedener *C. elegans* Larvenstadien bei permanenter Fluopyram-Inkubation von 10 ppm auf Agarplatten für 48 h.**

Die Inkubation mit FP startete mit verschiedenen Larvenstadien (n=10, jeweils): L1 (erste Reihe), L2 (zweite Reihe), L3 (dritte Reihe) sowie L4-Larven (letzte Reihe). Dargestellt ist die Momentaufnahme nach 48 h Behandlung auf Agarplatten mit FP 10 ppm (rot) und unter Kontrollbedingungen FP 0 ppm (orange). Nach 48 h haben sich die Kontrolltiere zu fertilen Adulten (Reihe 2-4) oder dem L4 Stadium (Reihe 1) entwickelt. In den ersten drei Reihen (L1-L3) führte die FP-Behandlung von 10 ppm zu einem Arrest in der Entwicklung in dem jeweils darauffolgenden Larvenstadium, während sich L4-Larven zu fertilen Adulten entwickelten (letzte Reihe). DIK-Optik, Eichstrich 100 µm, Aufnahmen Dr. Julia Camps.

### 3.2.4 FP-induzierte Phänotypen nach FP-Pulsbehandlung sind teilweise reversibel

Da gezeigt werden konnte, dass die FP-Behandlung zu einer verlangsamten Entwicklung sowie konzentrationsabhängig zu einem Entwicklungsarrest führt, sollte mit Hilfe von Pulsexperimenten untersucht werden, inwiefern der durch die FP-Behandlung ausgelöste Effekt des embryonalen und larvalen Arrests reversibel ist.

In den Pulsexperimenten wurden die Embryonen 8 min mit FP inkubiert. Nach der FP-Behandlung mit 10 ppm war die Entwicklung verlangsamt, die Embryonen waren aber in der Lage zu schlüpfen und sich zu Larven zu entwickeln (Daten nicht gezeigt). Ein 8 min andauernder Puls bei einer Konzentration von FP 50 ppm verlangsamte die Entwicklung der Embryonen und führte schließlich zum Arrest (Abbildung 3-10). Die Betrachtung von Ein- bis Zwei-Zell-Stadien nach der FP-Pulsbehandlung zeigte, dass nach dem kurzen Puls (8 min FP 50 ppm) lediglich noch je eine bzw. wenige Teilungen der Blastomeren möglich waren (Abbildung 3-10, Pfeile).



**Abbildung 3-10 | Fluopyram-Pulsbehandlung von *C. elegans* Embryonen auf Poly-L-Lysin Objektträgern.**

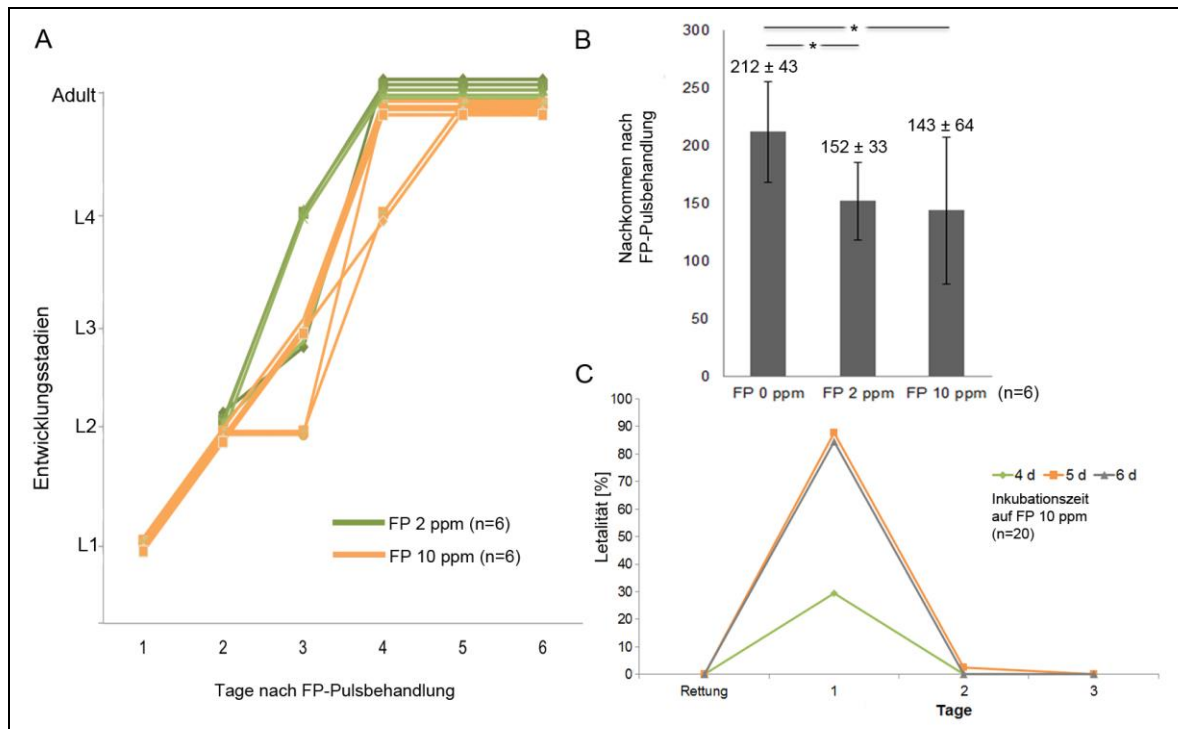
Dargestellt ist die zeitliche Abfolge in min eines Pulsexperiments an Embryonen mit einer FP-Konzentration von 50 ppm in aufeinanderfolgenden Aufnahmen. **Bild 1)** 8 min FP-Inkubation: Embryonen wurden zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten für 8 min mit FP behandelt. **Bild 2)** Start  $t=0$  min nach der Pulsbehandlung wurde FP durch Wasser ersetzt. **Bilder 3-4)** Die Entwicklung der Embryonen wurde nach 22 min und für weitere 77 min untersucht. Die Pfeile markieren Ein- bis Zwei-Zell-Stadien, deren Entwicklung sich über den Zeitraum von 77 min verlangsamt und letztendlich arretierte (24 h, Daten nicht gezeigt). DIK-Optik, Eichstriche 20  $\mu$ m, Aufnahmen Dr. Julia Camps.

FP-Konzentrationen von 10 ppm führten zunächst zum Arrest der *C. elegans* WT Larven in ihrer Entwicklung. Bei permanenter Behandlung führte diese Konzentration zur Letalität. Für die Puls-Behandlung von Larven auf Agarplatten wurde ein Puls als eine viertägige FP-Inkubation (10 ppm) definiert, da bis zu diesem Zeitpunkt die Larven zwar in ihrer Entwicklung arretieren, jedoch noch keine Letalität auftrat. Nach der Behandlung mit FP 2 war der induzierte larvale Arrest reversibel und die Würmer hatten Nachkommen (Abbildung 3-11, A), wobei deren Anzahl mit nur 75 % im Vergleich zu denen der unbehandelten Würmer reduziert war (Abbildung 3-11, B).

FP 10 ppm Pulsexperimente mit einer Pulsdauer von 4-6 Tagen führten zu larvalem Arrest, der unter FP-freien Bedingungen nur teilweise reversibel war. Würmer, die sich dennoch bis zum adulten Stadium entwickelten, hatten ebenfalls 75 % weniger Nachkommen im Vergleich zum unbehandelten WT (Abbildung 3-11, B).

Eine viertägige FP-Behandlung führte bei 30 % der Larven zu Letalität (Abbildung 3-11, A-C). Sowohl nach 5 als auch nach 6 Tagen FP-Behandlung war jeweils am 1. Tag unter FP-freien Bedingungen eine Mortalität von bis zu 90 % zu beobachten (Abbildung 3-11, C).

Es konnte gezeigt werden, dass FP-bedingte Defekte abhängig von der Dauer der Inkubation ( $\geq 4$  Tage bei Larven [10 ppm]) und der FP-Konzentration (50 ppm bei Embryonen) letal für *C. elegans* WT und somit irreversibel sind.



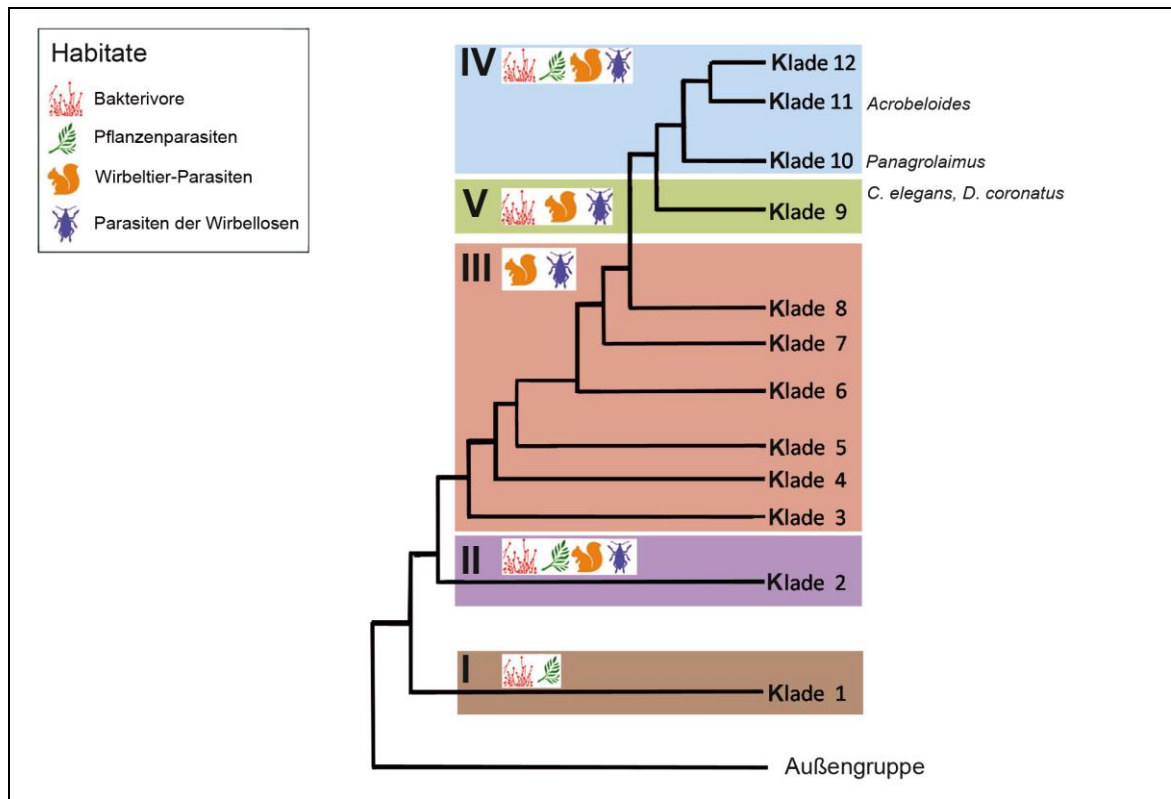
**Abbildung 3-11 | Fluopyram-Pulsbehandlung von *C. elegans* L1-Larven auf Agarplatten.**

**A)** Entwicklungszeiten von L1/L2-Larven nach 4 Tagen FP-Pulsbehandlung (2 bzw. 10 ppm; n=6). **B)** Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) der Anzahl der Nachkommen der Larven, die zunächst 4 Tage auf FP 2 oder 10 ppm inkubiert und dann auf FP-freie Bedingungen transferiert wurden. Im Vergleich zum unbehandelten WT war diese um 25 % reduziert. Fehlerindikatoren repräsentieren Standardabweichungen der jeweiligen Mittelwerte. **C)** Letalität von *C. elegans* nach FP-Pulsbehandlung in % (10 ppm; n=20, jeweils) für 4-6 Tage.

### 3.2.5 FP inhibiert die Entwicklung anderer freilebender Nematoden

Das Phylum der Nematoden umfasst diverse Lebensformen. Durch die Analyse von Sequenzdaten ribosomaler DNA konnten die Nematoden Spezies verschiedenen Kladen zugeordnet werden (Blaxter et al. 1998; Holterman et al. 2006). Der hier untersuchte bakterivore Modellorganismus *C. elegans* ist der Klade V (Blaxter et al. 1998) zuzuordnen. Pflanzenparasiten hingegen sind den Kladen I (Enoplia), II (Dorylaimia) und IV (Tylenchina) zugeordnet (Abbildung 3-12).

Um die Wirkung der FP-Behandlung auf freilebende Nematoden weiter zu untersuchen, wurden Vertreter der Klade IV des Phylums herangezogen, die wie *C. elegans* unter Laborbedingungen kultiviert werden können (Kiontke et al. 2011; Lewis et al. 2009).



**Abbildung 3-12 | Phylogenetischer Stammbaum der Nematoden.**

Das Phylum der Nematoden ist annotiert mit den Blaxter-Kladen (römische Ziffern) und den Holterman-Kladen (1-12) dargestellt (Holterman et al. 2006; Blaxter et al. 1998). Die Phylogenie beruht auf den Sequenzdaten ribosomaler DNA der kleinen Untereinheiten der Ribosomen und wird in Kladen unterteilt, die eine monophyletische Gruppe darstellen. Gezeigt sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nematoden, rechts neben den zugehörigen Holterman-Kladen. Zugehörig zu den Blaxter-Kladen sind die jeweiligen Habitate, in denen diese anzutreffen sind, dargestellt. So sind Pflanzenparasiten in den Kladen I, II und IV anzutreffen (van Megen et al. 2009). Modifizierte Abbildung nach Dillman et al. (2013).

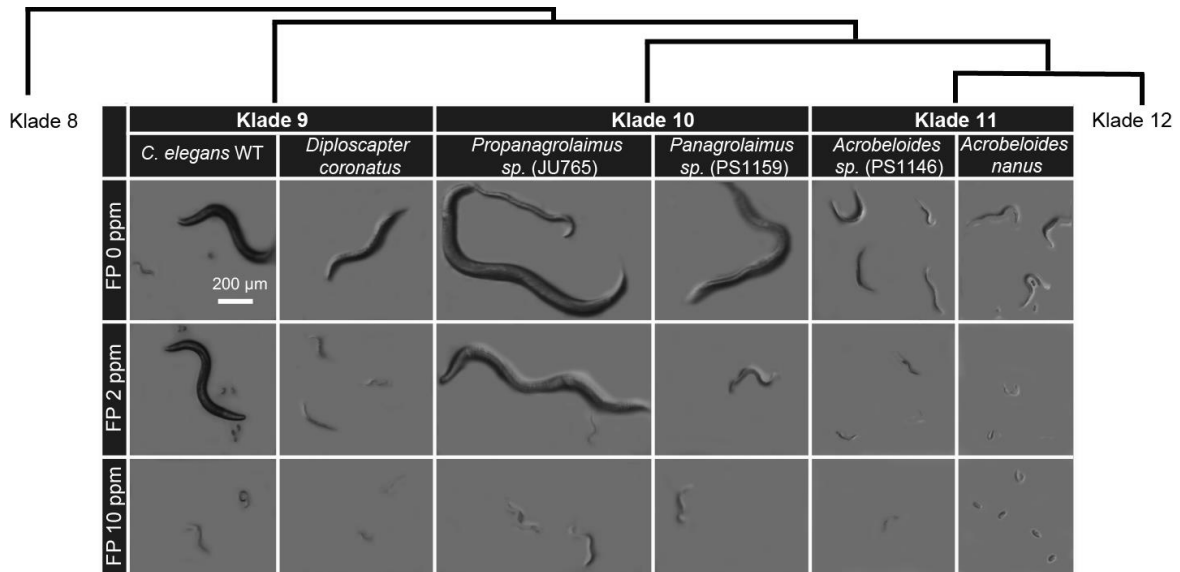
Die im Folgenden untersuchten Spezies der *Acrobelloidae* und *Panagrolaimidae* (Blaxter-Klade IV) erlauben die Untersuchung des Einflusses des Fortpflanzungsmechanismus auf die FP-Wirkung. Mit den *Acrobelloidae* und *Panagrolaimidae* wurden sowohl hermaphroditische Spezies, in denen selbstbefruchtende Hermaphroditen und einige Männchen vorkommen, als auch parthenogenetische, die die Entwicklung eines Eies ohne Befruchtung zu einem weiblichen Tier vollziehen, untersucht (Mittwoch 1978).

Die im Folgenden analysierten Gattungen *Panagrolaimus* und *Acrobelloides* sind den Holterman-Kladen 10 und 11 zugeordnet. Diese freilebenden Nematoden lassen sich wie *C. elegans* (Holterman-Klade 9) im Labor kultivieren. Da *Panagrolaimus* und *Acrobelloides* der Blaxter-Klade IV zuzuordnen sind, zu der auch Pflanzenparasiten gehören und in der sowohl hermaphroditische als auch der parthenogenetische Fortpflanzungsmodi auftreten, wurden diese hier verwendet. Letzterer Fortpflanzungsmodus ist der am weitesten verbreitete Modus der Pflanzenparasiten, wie z. B. in der Spezies der *Meloidogyne* (Hol-

terman-Klade 12), den pflanzenparasitischen Wurzelknoten-Nematoden (Castagnone-Sereno 2006; Lunt 2008). Die FP-Behandlung je eines Vertreters der zwei Fortpflanzungsmodi der jeweiligen Gattung sollte Aufschluss über die Übertragung auf nahe verwandte Nematoden geben.

Der parthenogenetische *Panagrolaimus sp.* (PS1159) zeigte einen larvalen Arrest bei einer Konzentration von FP 2 ppm, während der hermaphroditisch lebende *Propanagrolaimus sp.* (JU765) denselben konzentrationsabhängigen Arrest wie *C. elegans* WT in der larvalen Entwicklung bei FP 10 ppm zeigte (Abbildung 3-13, Mitte, Klade 10). Bei den untersuchten hermaphroditischen Spezies trat der larvale Arrest jeweils bei FP 10 ppm und damit bei einer höheren Konzentration als bei *C. elegans* auf, die gleichzeitig höher war im Vergleich zu den parthenogenetischen Spezies (FP 2 ppm). Am Beispiel der *Acrobelloides* Spezies (Holterman-Klade 11) sowie dem parthenogenetischen *Diploscapter coronatus* (Holterman-Klade 9 wie *C. elegans*) konnte diese Korrelation zwischen dem Fortpflanzungsmodus und der FP-Toleranz bestätigt werden (Abbildung 3-13).

Dadurch, dass der larvale Arrest in Folge einer FP-Behandlung auch bei anderen Vertretern des Nematoden Phylums gezeigt werden konnte, kann von einer nematiziden Wirkung von FP ausgegangen werden. Nachdem die optimalen Kulturbedingungen etabliert und die FP-Applikationsraten für *C. elegans* und andere freilebende Nematoden bestimmt sowie die Reversibilität des FP-Effekts aufgeklärt wurde, sollte anschließend die Aufnahme von FP untersucht werden.



**Abbildung 3-13 | Permanente Fluopyram-Behandlung von *C. elegans* und verschiedenen freilebenden Nematoden auf Agarplatten für 5-6 Tage.**

Die Inkubation mit FP startete jeweils mit Embryonen (n=20; P0-Generation), die abgelegt auf Agarplatten auf FP-Platten überführt wurden. Gezeigt ist eine Momentaufnahme der jeweiligen Agarplatten nach 5-6 Tagen Inkubation mit FP nebst Zuordnung der Spezies im phylogenetischen Kontext der Holterman-Kladen. Hermaphroditische Nematoden sind *C. elegans* WT der Klade 9, *Propanagrolaimus* (JU765) der Klade 10 sowie *Acrobeloides* sp. (PS1146) der Klade 11, wohingegen die Nematoden *Diploscapter coronatus* der Klade 9, *Panagrolaimus* (PS1159) der Klade 10 sowie *Acrobeloides nanus* der Klade 11 sich parthenogenetisch fortpflanzen. Nach 5-6 Tagen zeigt die jeweilige Kontrolle (FP 0 ppm) adulte Tiere der P0-Generation. Die Größenunterschiede sind speziesspezifisch. Die abgelegten Embryonen und Larven weisen auf die F1 Generation hin. Bei FP 2 ppm zeigen nur *C. elegans* und *Propanagrolaimus* (JU765) ein Bild wie in der Kontrolle, wohingegen die Entwicklung der anderen Spezies im Larvenstadium arretierte. Bei FP 10 ppm wird dieser Arrest bei allen Spezies, abgesehen von *Acrobeloides nanus*, bei dem die Entwicklung der aufgebrauchten Embryonen bereits arretierte, sichtbar. Binokular-Optik, Eichstrich 200 µm.

### 3.3 Aufnahmemechanismus von Fluopyram

#### 3.3.1 Die Wirkung von FP ist unabhängig von der Nahrungsaufnahme

Durch die Anwendung von FP auf Agarplatten, verdünnt in einer *E. coli* Bakterienkultur, ergeben sich verschiedene Möglichkeiten der Wirkstoffaufnahme. Eine gleichzeitige Aufnahme von FP mit den *E. coli* Bakterien als Nahrung mit anschließender Resorption im Darm stellt einen wahrscheinlichen Aufnahmeweg dar. Als alternativen Aufnahmeweg muss auch das Passieren des Wirkstoffs über die Kutikula betrachtet werden. Um die Aufnahme von FP aufzuklären, wurden, wie im FP-Assay (3.1.1), die zu behandelnden Würmer mit *E. coli* plus FP gefüttert. Anschließend wurde überprüft, ob eine kalorische Restriktion (reduzierte Nahrungsaufnahme) zu einer Abschwächung der FP-induzierten Effekte durch reduzierte FP-Aufnahme führt.

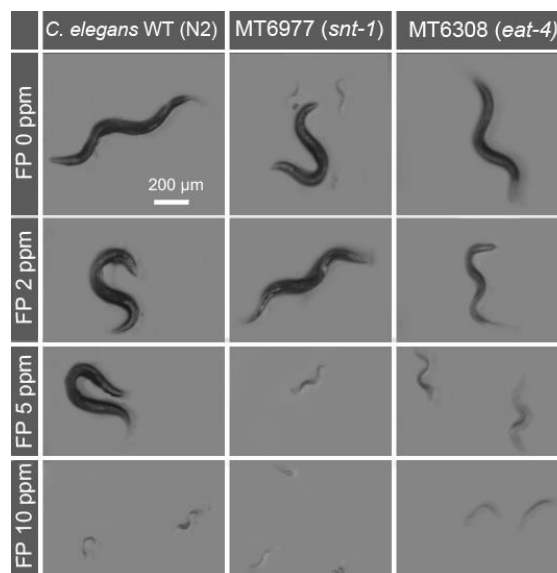
Hierzu wurden die *C. elegans* Mutanten MT6977 (*snt-1*) und MT6308 (*eat-4*) untersucht, die kalorische Restriktion durch fehlerhaftes Pharynxpumpen zeigen. Die Synaptogamin 1



Isoform (*snt-1*) ist verantwortlich für synaptische Vesikel-Endocytose (Mathews et al. 2007). Mutationen im *snt-1* Gen führen zu einer verlangsamten Nahrungsaufnahme (Wormbase.org). *Eat-4* Mutanten zeigen neuronale Defekte, die ebenfalls zu einer geringeren Nahrungsaufnahme führen (Lee et al. 1999).

Beide Mutanten MT6977 (*snt-1*) und MT6308 (*eat-4*) arretierten in ihrer larvalen Entwicklung bei einer FP-Konzentration  $\geq 5$  ppm (Abbildung 3-14, 3. Reihe). Im Vergleich dazu zeigt *C. elegans* WT einen larvalen Arrest erst bei einer Konzentration von FP 10 ppm. Beide Mutanten hatten weiterhin bei einer Behandlung mit FP 2 ppm keine Nachkommen (Daten nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass FP nicht ausschließlich über die Nahrung aufgenommen wird, da eine reduzierte Nahrungsaufnahme sonst zu einem weniger starken FP-Effekt hätte führen müssen.



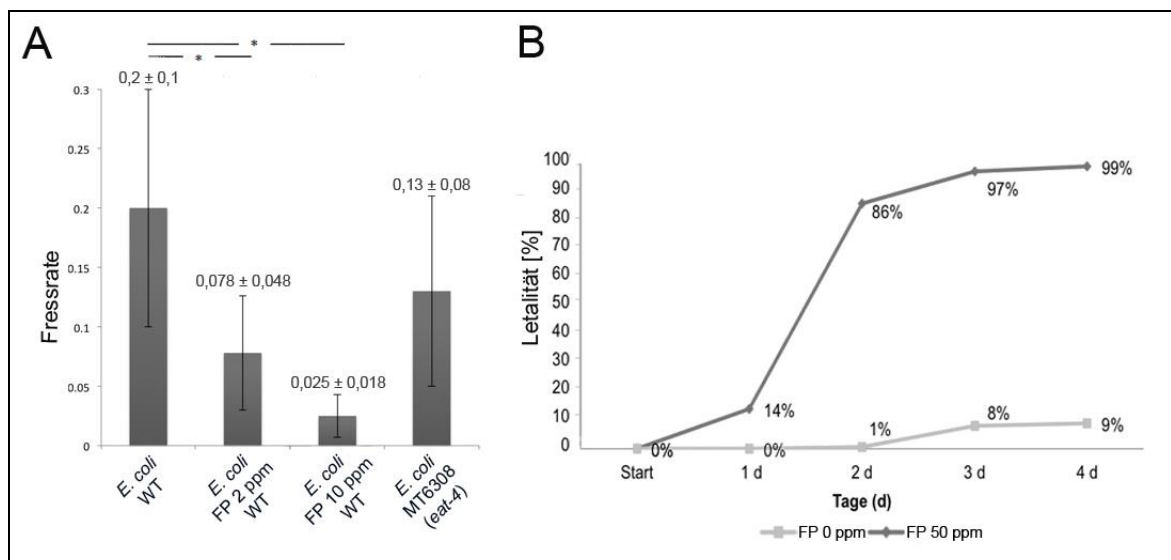
**Abbildung 3-14 | Fluopyram-Inkubation von kalorisch restriktiven *C. elegans* Mutanten auf Agarplatten im Vergleich zum *C. elegans* WT.**

Gezeigt ist eine Momentaufnahme nach 5 Tagen der Inkubation des *C. elegans* WT und der *C. elegans* Mutanten MT6977 (*snt-1*) und MT6308 (*eat-4*) bei FP-Konzentrationen von 0-10 ppm. Die Inkubation auf Agarplatten startete mit abgelegten Embryonen. Bei FP 2 ppm erreichen der WT und *snt-1* Tiere nach 5 Tagen das Adult-Stadium, wohingegen *eat-4* Tiere sich zu L4-Larven entwickelt haben. Bei FP 5 ppm wird nur noch der WT adult und die Entwicklung beider Mutanten arretiert im Larvenstadium. Bei FP 10 ppm ist bei allen Stämmen ein Arrest in der larvalen Entwicklung zu beobachten. Binokular-Optik, Eichstrich 200 µm.

Mittels eines weiteren Assays sollte die durch die FP-Behandlung hervorgerufene Veränderung der Nahrungsaufnahme quantifiziert werden. Im OD<sub>600</sub>-Assay (Gomez-Amaro et al. 2015) wurde die Fressrate von FP-behandelten Tieren in 48-Well Platten ermittelt (siehe 2.9.1).

Die Nahrungsaufnahme der Würmer wurde als die Differenz der OD<sub>600</sub> der Bakterienkulturen ohne und mit Würmern nach 2 Tagen Inkubation definiert. Zur Validierung dieses Assays wurde ebenfalls eine kalorisch restriktive Mutante (MT6308 [*eat-4*]) getestet, die Defekte in der Nahrungsaufnahme zeigt. Im Vergleich zum *C. elegans* WT zeigte MT6308 eine um 25 % reduzierte Aufnahme von Bakterien. Die Fressraten der FP-behandelten Würmer nahmen signifikant, konzentrationsabhängig (2 und 10 ppm) ab ( $t(10)=2,638$ ;  $p<0,024$ ) (Abbildung 3-15, A). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Hauptaufnahmeweg von FP nicht die Nahrung sein kann. Die verminderte Nahrungsaufnahme durch die FP-Behandlung, könnte auf einer Störung des Energiehaushaltes durch Inhibition von Komplex II basieren.

Um die Nahrung als Aufnahmeweg auszuschließen, wurde im Folgenden ein Kälte-Assay (+4 °C) an einer gemischten Population von Würmern durchgeführt (Bernt et al. 1998) (siehe 2.9.2). Durch die kältebedingte Paralyse sind die Würmer nicht in der Lage Bakterien aufzunehmen. Eine Inkubation bei +4 °C (2 Tage) mit FP 50 ppm ist letal (Abbildung 3-15, B). Kontrolltiere ohne FP regenerieren hingegen vollständig nach der Kälte-Paralyse. Die FP-Wirkung wird demnach nicht über eine aktive Aufnahme von FP über die Nahrung erzielt.



**Abbildung 3-15 | Darstellung der Fressrate und der Letalität (Kälte-Assay) von *C. elegans* unter Fluopyram-Einfluss.**

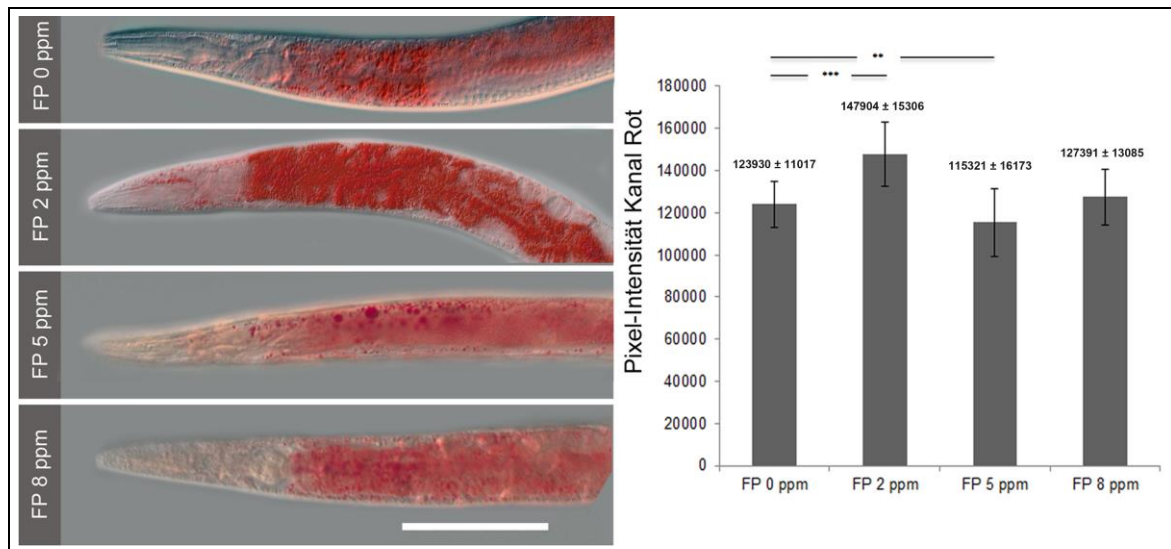
**A)** Die Fressrate ist als gemittelte Differenz ( $n=16$ , jeweils;  $\pm$  Standardabweichung) der OD<sub>600</sub> einer *E. coli* Suspension ohne und mit ca. 10 Würmern pro Well nach 2 Tagen in einer 48-Well Platte dargestellt (siehe 2.9.1). Die Fressrate des *C. elegans* WT wird bei verschiedenen FP-Konzentrationen mit der kalorisch restriktiven Mutante MT6308 (*eat-4*) verglichen. **B)** Dargestellt ist die prozentuale Letalität einer gemischten *C. elegans* Population auf Agarplatte, ohne und mit FP (50 ppm), nach Inkubation in der Kälte (+4 °C) für entweder 1, 2, 3 oder 4 Tage ( $n=4$ , jeweils). In der Kälte paralysierte Tiere, die nach 24 h bei +20 °C keine Bewegung zeigten, wurden als letal gewertet.

### 3.3.2 Veränderung des Fettstoffwechsels unter FP-Einfluss

Die Inaktivierung der oxidativen Phosphorylierung und der ATP Synthese führt zu einem reduzierten Fettgehalt in *C. elegans* (Yen et al. 2010). Da in den vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass die Aufnahme von FP zudem mit einer geringeren Nahrungsaufnahme korrelierte, sollte die Nahrungsverwertung durch die Fettspeicherung unter FP-Einfluss untersucht werden. Aufgenommene Nahrung in Form von Bakterien wird in Energie umgewandelt und in die Fettakkumulation umdirigiert. Um die Fettvorräte im Wurm zu identifizieren, ist Oil Red O (siehe 2.7) die Methode der Wahl (Rourke et al. 2009).

Die Fettverteilung im unbehandelten Wurm ist auf die Zellen des Darms konzentriert. Durch die FP-Behandlung veränderte sich die Verteilung der Fettmoleküle, welche nun neben dem Darm, auch im Pharynx-Bereich und in der Hypodermis nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3-16, A, links FP 2 und 5 ppm). Eine FP-Behandlung mit 2 ppm resultierte in einer signifikant erhöhten (25 % mehr im Vergleich zum WT) Fettkonzentration ( $t(48)=48,315$ ;  $p<0,001$ ) (Abbildung 3-16, A). Demgegenüber zeigen Würmer, die mit FP-Konzentrationen von 5 und 8 ppm behandelt wurden, eine zum unbehandelten WT vergleichbare Fettkonzentration (Abbildung 3-16, A Diagramm).

Die Erhöhung der Fetteinlagerung in FP 2 ppm behandelten Würmern könnte auf einen veränderten Metabolismus durch die Hemmung von Komplex II zurückzuführen sein und als möglicher Weg der alternativen Energiegewinnung dienen. Würmer, die mit letalen FP Konzentrationen  $\geq$ FP 5 ppm behandelt wurden, können den Energiemangel nicht durch erhöhte Fetteinlagerung kompensieren.



**Abbildung 3-16 | Die Verteilung der Oil Red O Fettfärbung in *C. elegans* nach permanenter Fluopyram-Behandlung.**

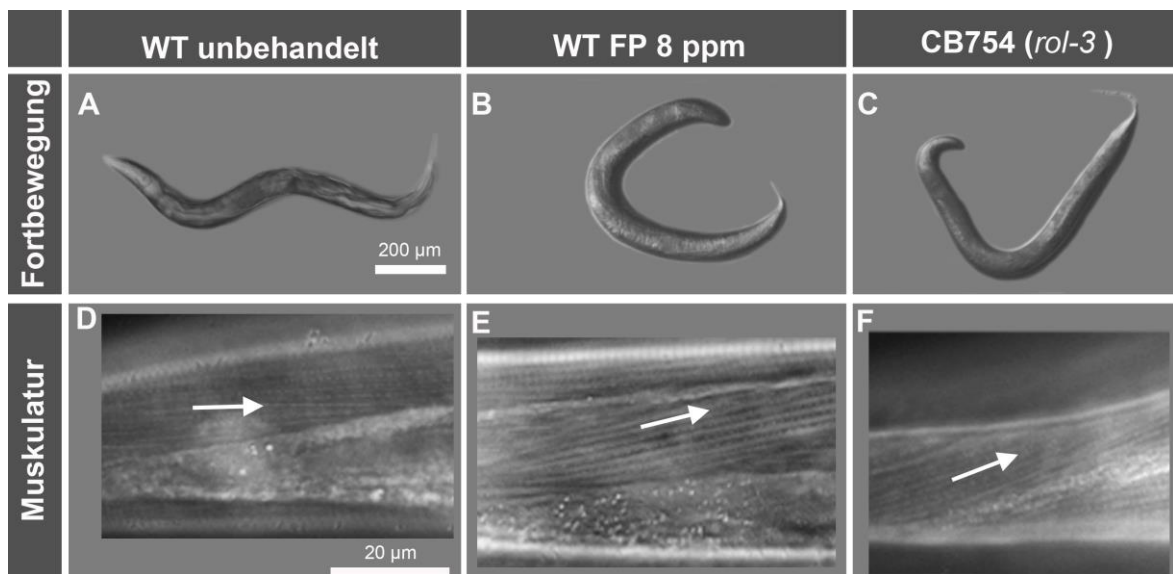
Darstellung der Oil Red O Anfärbung und der gemittelten Pixel-Intensität der Fettfärbung ( $\pm$  Standardabweichung) der Würmer, die nach 5 Tagen permanenter FP-Behandlung in den Konzentrationen 0–8 ppm fixiert und mit Oil Red O (siehe 2.7) angefärbt wurden ( $n=25$ , je Konzentration, gestartet mit abgelegten Embryonen). Die Pixel-Intensität der Fettfärbung wurde anhand der Pixel-Intensität im „roten“ Kanal statistisch ausgewertet. Lichtmikroskopische-Optik, Eichstrich 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.3 Charakterisierung der FP-Aufnahme über die Kutikula

Da die zuvor gezeigten Ergebnisse des FP-Assays darauf schließen lassen, dass der Darm nicht der alleinige Aufnahmeort von FP sein kann, soll der Frage nachgegangen werden, ob die Kutikula FP-permeabel ist. Ein Hinweis darauf lieferte bereits der FP-induzierte Arrest während der Embryonalentwicklung (3.2.1), der auf eine Permeabilität der Eihülle schließen lässt.

Während der postembryonalen Entwicklung konnten Phänotypen dokumentiert werden, die auf FP-Nebeneffekte zurückzuführen sein könnten. Ab FP-Konzentrationen von  $\geq 2$  ppm traten links drehende ‚ROLLER‘ Phänotypen (Abbildung 3-17, B) und Knicke in der Kutikula junger Larven nach dem Schlupf (Abbildung 3-4, Pfeile) auf. Die sinusoidale Bewegung eines *C. elegans* WT konnte in einer dauerhaft bei FP 8 ppm inkubierten Population bei etwa 20 % der Tiere nicht dokumentiert werden. Diese Tiere (20 %) zeigten eine dem ROLLER-Phänotyp entsprechende Fortbewegungsmuster (Abbildung 3-17, A und B). Um zu untersuchen, ob dies auf eine fehlerhafte Ausbildung der unter der Kutikula liegenden Muskelstränge zurückzuführen ist, wurden diese mit Hilfe von Polarisationsmikroskopie analysiert (Abbildung 3-17, a-c) (Peixoto et al. 2000). Myofibrillen, die im WT geradlinig verlaufen (Abbildung 3-17, a), sind nach dauerhafter FP-Behandlung (2-8 ppm)

sowie in der ebenfalls untersuchten linksdrehenden ROLLer Mutante CB754 (*rol-3*) (Abbildung 3-17, b und c) verdreht. Diese gedrehten Myofibrillen führen nach FP-Behandlung zu einer linksdrehenden, rollenden Bewegung der behandelten Würmer (Abbildung 3-17, b und B). Zudem könnten sie eine Veränderung der Aufhängung der Kutikula zur Folge haben, die aus einer FP-Behandlung während einer vorrangegangenen Häutung resultieren könnte.



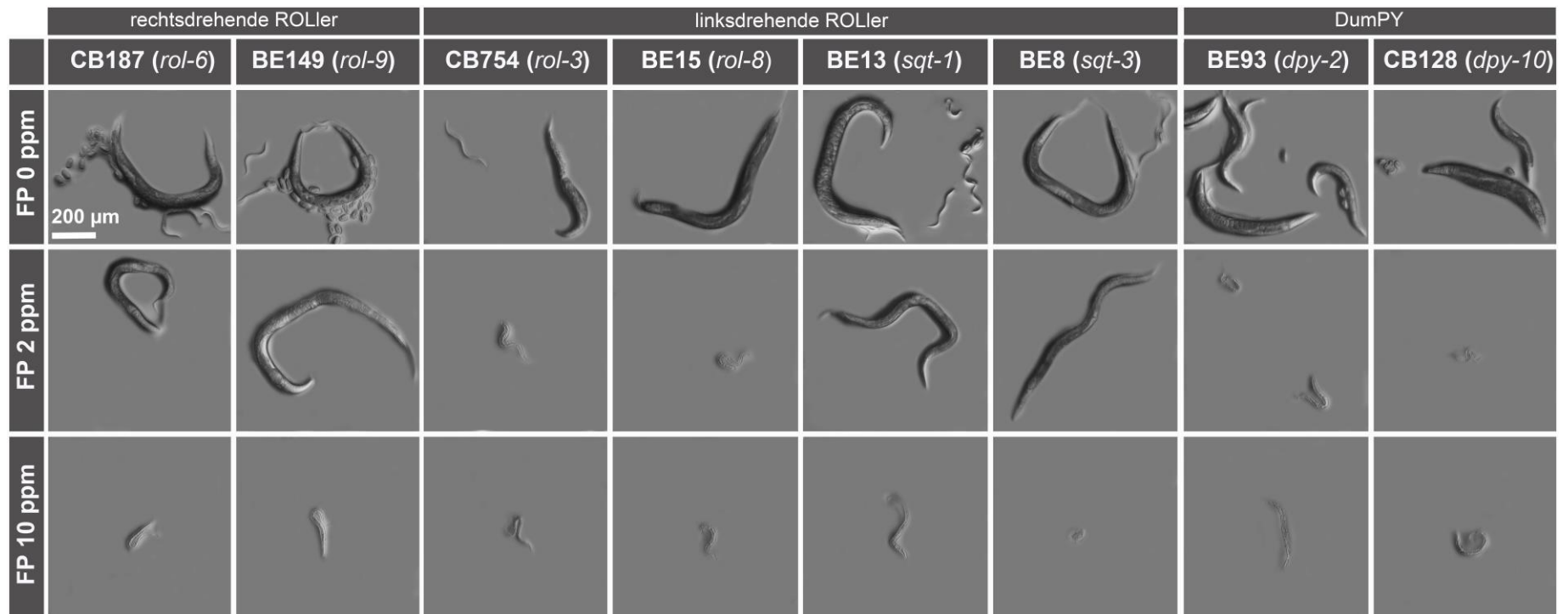
**Abbildung 3-17 | Darstellung der Fortbewegung und der Muskulatur des *C. elegans* WT und der *rol-3* Mutante.**

**A-C)** Auf Agarplatte zeigt der *C. elegans* WT eine fast sinusförmige Bewegung (A). Nach permanenter FP-Behandlung (8 ppm, Start: abgelegte Embryonen) für 8 Tage zeigen ca. 20 % der Tiere des WT eine Fortbewegung (B), die der einer sich linksdrehenden ROLLer-Mutante, z. B. *rol-3* (C), entspricht. **D-F)** Gezeigt ist der Ausschnitt eines Muskelquadranten von adulten *C. elegans* Tieren. Die Pfeile zeigen die Verlaufsrichtung der Myofibrillen im Muskelgewebe an, die entweder geradlinig (D) oder spiralig (E-F) ist. Binokular-Optik (A-C), Polarisationsmikroskopie (D-F), Eichstriche 200 µm und 20 µm.

Weiterhin sollten *C. elegans* Kutikulakollagen-Mutanten bezüglich der FP-Sensitivität untersucht werden. Es wurden die linksdrehenden Mutanten CB754 (*rol-3*), BE15 (*rol-8*), BE13 (*sqt-1*) und BE8 (*sqt-3*), die rechtsdrehenden Mutanten CB187 (*rol-6*), BE148 (*rol-9*) sowie Mutanten mit einem DumpY Phänotyp BE93 (*dpy-2*) und CB128 (*dpy-10*) analysiert. Die FP-Behandlung auf Agarplatten mit 2 ppm, der subletalen Konzentration für den *C. elegans* WT, führte zu einem larvalen Arrest von linksdrehenden (CB754, BE15) und DumpY Mutanten (BE93 und CB128) (Abbildung 3-18). ROL-3 (CB754) ist in *C. elegans* WT essentiell für die Ausbildung und Form der Kutikula (Jones et al. 2013). ROL-8 (BE15) ist

ein kutikuläres Kollagen und interagiert mit anderen kutikulären Kollagenen, wie *dpy-10* (BE128) und *sqt-1* (BE13) (Levy et al. 1993; Page und Johnstone, 2007).

Die gesteigerte Sensitivität von Kutikulakollagen-Mutanten gegenüber FP untermauert die Hypothese, dass FP vornehmlich über die Kutikula aufgenommen wird. Induzierte Defekte bezüglich der Kutikula-Bildung im WT, hier erkennbar durch ein verändertes Bewegungsmuster, deuten zudem auf alternative Angriffspunkte des Succinat-Dehydrogenase-Inhibitors FP hin.



**Abbildung 3-18 | Permanente Fluopyram-Behandlung von *C. elegans* Stämmen mit Mutationen in Genen, die für Bestandteile der Kutikula kodieren.**

Die FP-Behandlung für 5 Tage startet mit abgelegten Embryonen, die auf Agarplatten mit FP-Konzentrationen von 0-10 ppm überführt wurden. Dabei handelte es sich um Embryonen der rechtsdrehenden *C. elegans* ROLler Mutanten: CB187 (*rol-6*) und BE148 (*rol-9*); der linksdrehenden ROLler Mutanten: CB754 (*rol-3*), BE15 (*rol-8*), BE13 (*sqt-1*) und BE8 (*sqt-3*) sowie der *C. elegans* DumPY Mutanten: BE93 (*dpy-2*) und CB128 (*dpy-10*). Gezeigt ist jeweils eine Momentaufnahme der Agarplatten nach 5 Tagen. **1. Reihe**) Adulte Tiere der P0-Generation plus Embryonen und Larven der F1-Generation. **2. Reihe**) Adulte Tiere haben sich nur im Falle der *rol-6*, *rol-9*, *sqt-1* und *sqt-3* Mutanten entwickelt, wohingegen die Entwicklung von zwei linksdrehenden ROLler Mutanten (*rol-3* und *rol-8*) und zwei DumPY Mutanten (*dpy-2* und *dpy-10*) im frühen Larvenstadium arretiert. **3. Reihe**) Die Entwicklung aller Mutanten arretiert im frühen Larvenstadium bei einer FP 10 ppm Behandlung. Binokular-Optik, Eichstrich 200 µm, Aufnahmen Dr. Julia Camps.

### 3.3.4 Die FP-Behandlung führt zu einer Veränderung der äußeren Morphologie von *C. elegans*

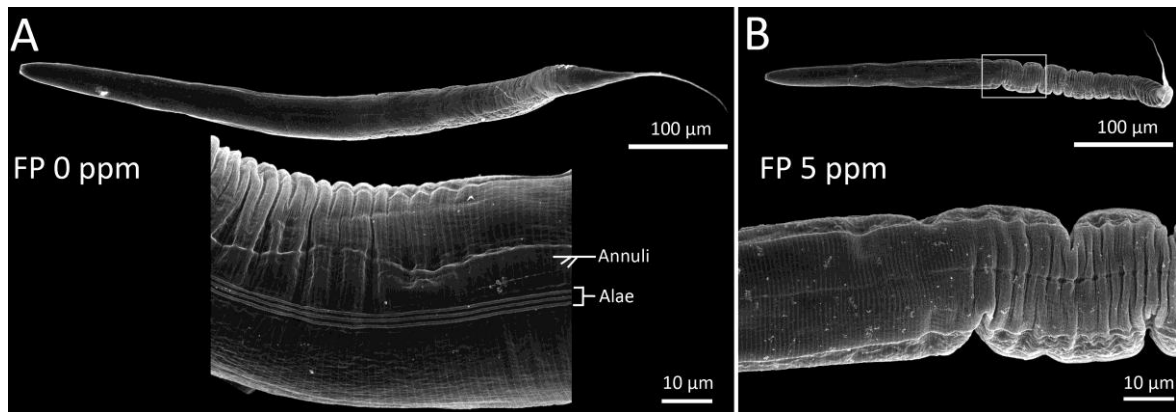
Um zu überprüfen, ob die Inkubation mit FP direkt zur Veränderung der Kutikula des WT führt, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die Rasterelektronenmikroskopie erlaubt es Oberflächenstrukturen detailliert darzustellen und so Veränderungen zu analysieren.

Die transparente Kutikula von *C. elegans* ist eine dreischichtige extrazelluläre Matrix, die den Wurm schützt und die gesamte Körperoberfläche bedeckt (Abbildung 1-3). Auf der Oberfläche bildet die Kutikula die regelmäßigen, umlaufenden Umfangsrippen (Annuli) (Abbildung 3-19, A). In dem L1-, dem Dauer- und dem adulten Stadium besitzt *C. elegans* über die ganze Körperlänge zwei laterale Kutikulafortsätze, die Alae. Die ringförmig verlaufenden Annuli werden lateral von den längsverlaufenden Alae unterbrochen (Abbildung 3-19, A). Diese beiden Strukturen sind bei der schlängelnden Fortbewegung auf festen Medien notwendig.

Die rasterelektronenmikroskopische Analyse der FP-behandelten Tiere (5 ppm, 5 Tage, Start mit Embryonen) zeigte eine Veränderung des posterioren Bereiches des Wurmes, der sich durch eine Faltenbildung der Kutikula auszeichnete (Abbildung 3-19, B). Dieser zusammengezogene Bereich der Kutikula korreliert mit den Strukturen des Darms und damit dem Pseudocoel. Dabei sind zunächst die Epidermis-Strukturen auf der lateralen Seite betroffen, die tiefe Furchen aufzeigen (Abbildung 3-19, B). Dauerhaft FP-behandelte Tiere zeigen keine Defekte in der Verteilung der Annuli sowie in der Anzahl der Alae.

Aufgrund der Letalität und des Entwicklungsarrests war lediglich eine dreitägige Behandlung in den FP-Konzentrationen 8 und 10 ppm (Start mit L3-Stadium) möglich. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zeigte schwächer ausgeprägte Phänotypen (Daten nicht gezeigt). Die elektronenmikroskopische Auswertung weist darauf hin, dass sich FP-behandelte Würmer bedingt durch einen möglicherweise fehlerhaft aufgebauten hydrostatischen Druck des Pseudocoels, als Folge der Fixierung für die Elektronenmikroskopie, im posterioren Teils des Wurmes zusammenziehen.





**Abbildung 3-19 | Rasterelektronenmikroskopische Aufsicht von *C. elegans* WT nach Fluopyram-Behandlung.**

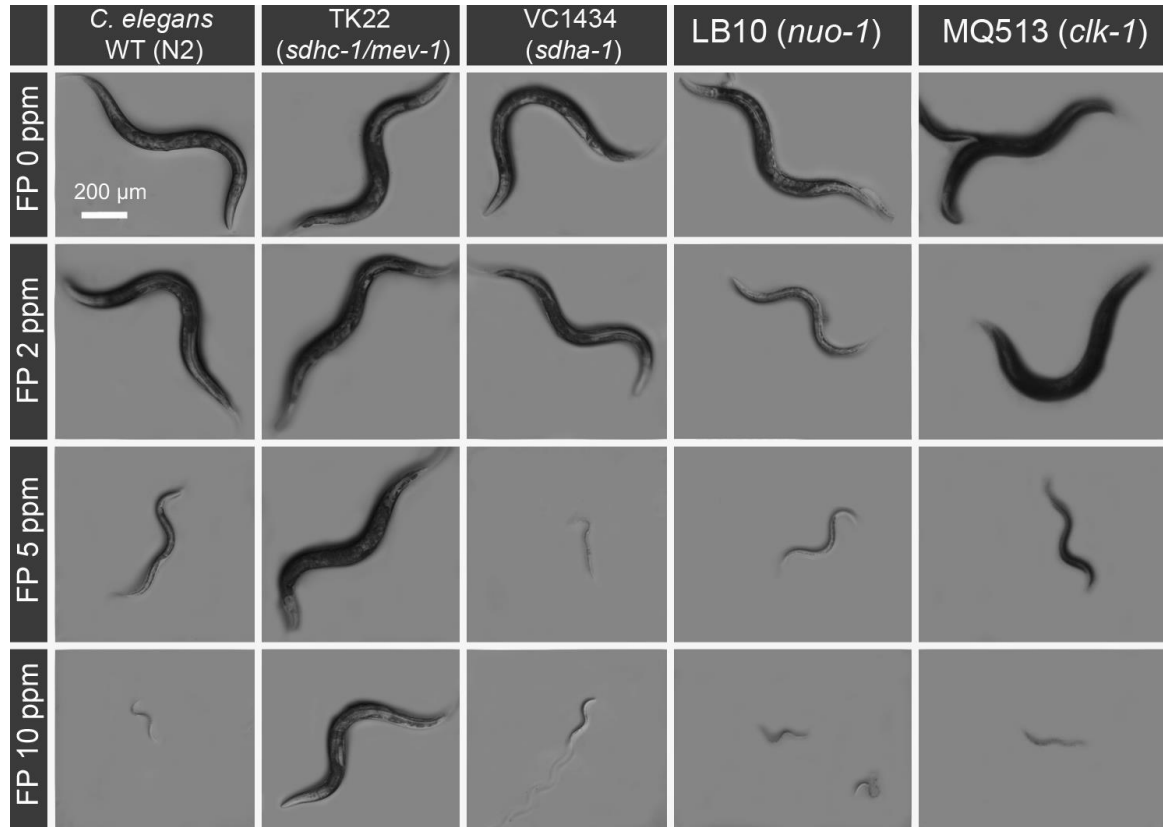
**A)** Die Oberflächeneigenschaften entlang eines adulten, unbehandelten *C. elegans* WT zeigen viele Annuli die in regelmäßigen, transversalen Reihen senkrecht zu den dreifach angeordneten Alae sichtbar sind. **B)** Darstellung eines Wurms nach 5 Tagen Inkubation mit FP 5 ppm (Start abgelegte Embryonen, siehe 2.6.4.2). Die FP-behandelten Würmer zeigten einen faltigen und geschrumpften posterioren Teil des Wurmes mit tiefen Furchungen der lateralen Seiten (Alae) sowie die Faltung der Annuli auf der ventralen Seite (zugewandte Seite in der Abbildung). Rasterelektronenmikroskopische Optik, Eichstriche 100 µm und 10 µm.

### 3.4 Mutationen in der *C. elegans* mitochondrialen Elektronentransportkette können zu Resistenz gegen die Fluopyram-Behandlung führen

Komplex II der in den Mitochondrien lokalisierten Elektronentransportkette ist der Angriffspunkt von FP in Pilzen (Avenot und Michailides 2010). Im Folgenden sollte die Wirkung von FP auf *C. elegans* Mutanten mit Fehlfunktionen in den Komplexen I und II der Elektronentransportkette untersucht werden. Diese Komplexe sind im Ablauf der Elektronentransportkette essentiell für die Einspeisung von Elektronen und ermöglichen so den Aufbau des Redoxpotentials (1.3).

Die *C. elegans* *mev-1* Mutante (TK22) besitzt eine Punktmutation, die zum Austausch eines Glycins (G) zu Glutaminsäure (E) an Position 71 der SDHC-Untereinheit des Komplexes II führt (Ishii et al. 1990). In der *sdha-1* Mutante (VC1434) ist eine 317 Aminosäuren lange Sequenz, die in der Untereinheit SDHA (Komplex II) deletiert ist. Neben diesen beiden Komplex II Mutanten wurde die Komplex I Mutante LB10 (*nuo-1*) untersucht. *nuo-1* kodiert für die NADH-bindende Untereinheit von Komplex I (Tsang et al. 2001). Zusätzlich zu den Komplex I und II Mutanten wurde MQ513 (*clk-1*) analysiert. Diese besitzt eine Mutation im *clk-1* Gen, das für die Biosynthese des Elektronencarriers Ubichinon verantwortlich ist (Schaar et al. 2015).

Die Mutanten LB10, MQ513 und VC1434 zeigen eine Sensibilität gegenüber FP, die mit dem WT vergleichbar ist. Sie arretierten in ihrer Entwicklung bei einer FP-Konzentration von  $\geq 5$  ppm (Abbildung 3-20). Die *C. elegans mev-1* Mutante hingegen zeigte eine Resistenz gegen FP-Konzentrationen, die für den WT letal sind (Abbildung 3-20).



**Abbildung 3-20 | Permanente Fluopyram-Behandlung des *C. elegans* WT und verschiedenen *C. elegans* Stämmen mit Mutationen in der mitochondrialen Elektronentransportkette auf Agarplatten für 6 Tage.**

Die Inkubation mit FP startete jeweils mit Embryonen ( $n=50$ ; P0-Generation), die sich in der späten Embryogenese nach der Ablage auf Agarplatten befanden. Gezeigt ist eine Momentaufnahme der jeweiligen Agarplatten nach 6 Tagen Inkubation mit FP. Die Kontrolle (FP 0 ppm) zeigt adulte Tiere der P0-Generation des WT und der *C. elegans* Mutanten TK22 (*sdhc-1/mev-1*), VC1434 (*sdha-1*), LB10 (*nuo-1*), MQ513 (*clk-1*). Die F1-Generation ist teilweise in Form von Embryonen im Uterus erkennbar. Bei FP 2 ppm zeigen alle Stämme eine verlangsamte Entwicklung. Bei FP 5 und 10 ppm arretiert die Entwicklung aller Stämme im Larvenstadium, bis auf die *C. elegans mev-1* (TK22) Mutante, wo sich adulte Tiere mit F1 Embryonen im Uterus entwickeln. Binokular-Optik. Eichstrich 200  $\mu\text{m}$ .

Die *C. elegans mev-1* Mutante tolerierte FP-Konzentrationen von 10 ppm, der letalen Dosis des WT. Bis zu einer Konzentration von FP 40 ppm wurden die *C. elegans mev-1* mutanten Tiere adult (7 Tage permanente Behandlung, Daten nicht gezeigt). Bei dauerhafter Haltung auf FP 10 ppm Agarplatten produzierten *C. elegans mev-1* Mutanten im Gegensatz zum WT Nachkommen ( $\sim 8$  Tage) (Abbildung 3-21;  $t(18)=3,9$ ;  $p<0,001$ ). In der Literatur wird die Nachkommenzahl der *mev-1* Mutante als deutlich reduziert (25 %) ge-

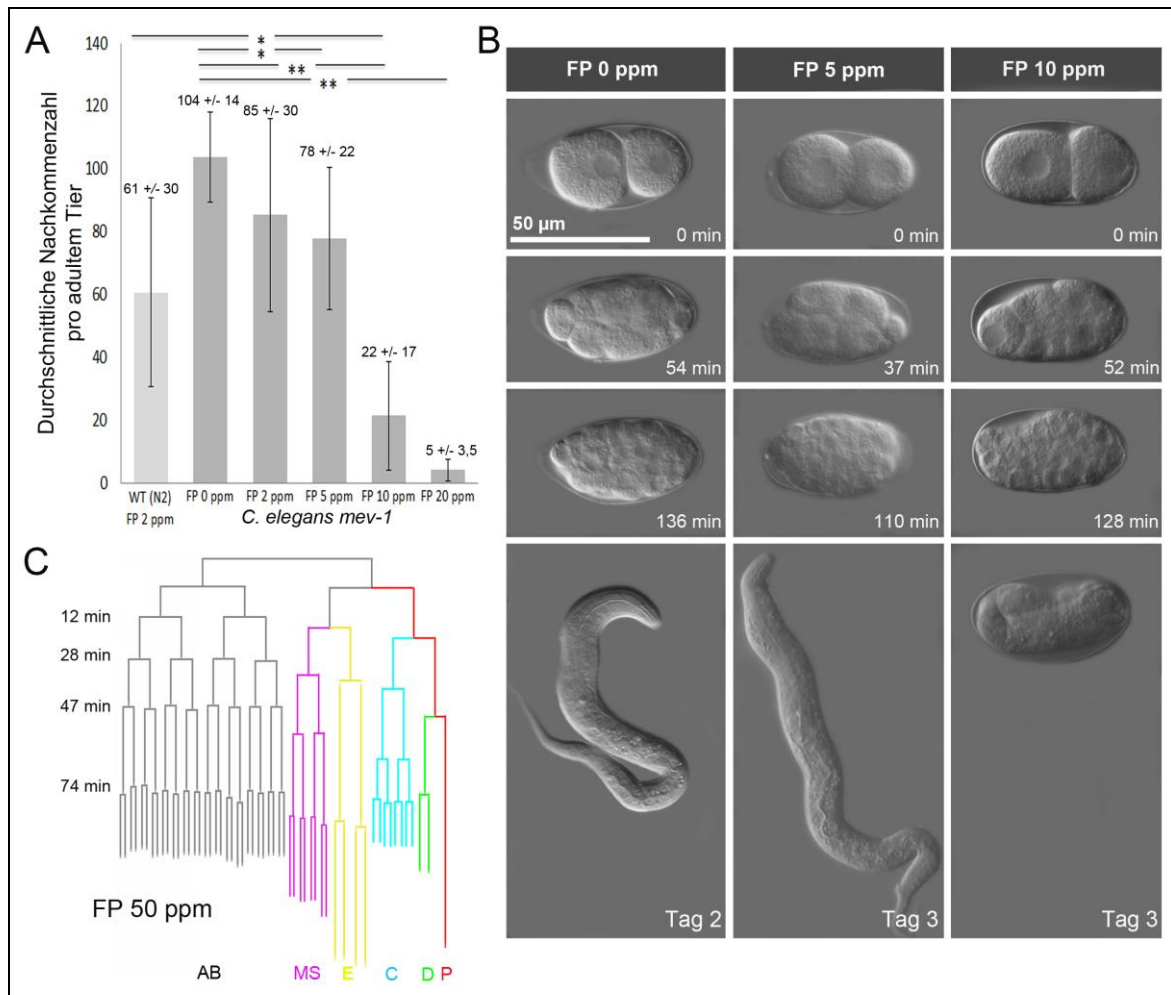
genüber dem WT beschrieben (Ishii et al. 1990). Die FP-Behandlung der *C. elegans mev-1* Mutante führt mit steigenden FP-Konzentrationen zu einer weiteren Reduktion der Nachkommenzahl (Abbildung 3-21, A).

Mikroskopische Analysen der Embryogenese der *C. elegans mev-1* Mutante (FP-Assay 3.1.1) zeigten, dass Embryonen bis zu einer Konzentration von FP 5 ppm schlüpfen (Abbildung 3-21, B). Im Gegensatz zum *C. elegans* WT können sich *mev-1* mutante Embryonen bei FP 10 ppm erfolgreich zu einer Larve entwickeln, schlüpfen jedoch nicht unter dem Mikroskop. Auf Agarplatten waren die Embryonen bei FP-Konzentrationen von 10 ppm in der Lage zu schlüpfen. Aufgrund der verlangsamten Entwicklung der *C. elegans mev-1* Mutante (Ishii et al. 1990) verlängerte sich die Beobachtung der Embryogenese dieser Mutante unter dem Mikroskop auf 3 Tage.

4-D-mikroskopische Analysen der *C. elegans mev-1* Mutante zeigten im Vergleich zum WT keine Verlangsamung des Zellzyklus in der frühen Embryonalentwicklung (Abbildung 3-21, C). Bei einer FP-Behandlung mit 50 ppm arretierten Embryonen der *C. elegans mev-1* Mutante nicht in ihrer Entwicklung, sondern entwickelten sich zu einer Larve, die jedoch auch hier nicht in der Lage war zu schlüpfen (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *C. elegans mev-1* Mutanten resistent gegen FP sind, da für den WT letale Konzentrationen nicht zu einem Arrest der Entwicklung führen. Eine Mutation in der Ubichinon-Bindestelle von Komplex II der Elektronentransportkette, wie sie die *C. elegans mev-1* Mutante trägt, ist daher ein vielversprechender Kandidat für die molekulare Analyse der Wirkungsweise von FP.

Zur detaillierten Aufklärung der potenziellen Angriffsstelle von FP in der mitochondrialen Elektronentransportkette von *C. elegans* wurden nun Auswirkungen einer FP-Behandlung auf die Morphologie und Funktion der Mitochondrien sowie der Aufbau des mitochondrialen Netzwerks genauer betrachtet.



**Abbildung 3-21 | Analyse der *C. elegans mev-1* Mutante bezüglich Nachkommen und Embryogenese unter Fluopyram-Einfluss.**

**A)** Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) der Nachkommen von jeweils 15 adulten Tieren (pro Balken) des *C. elegans* WT und der *C. elegans mev-1* Mutante über einen Ablagezeitraum von 11 Tagen auf Agarplatten mit FP-Konzentrationen von 0-20 ppm. **B)** Lebendbeobachtung (DIK-Optik) von *C. elegans mev-1* Embryonen (Start: 2-Zell-Stadium, 1. Reihe; n=5) auf Objektträgern mit verschiedenen FP-Konzentrationen (0-10 ppm). **1. Reihe:** 2-Zell-Stadien. **2.-3. Reihe:** Proliferationsstadien. **4. Reihe:** Geschlüpfte L1-Larven bei FP 0 und 5 ppm an Tag 2 bzw. Tag 3. Kein Schlüpfen bei FP 10 ppm an Tag 3. Eichstrich 50  $\mu$ m. **C)** 4-D-Mikroskopie-Analyse der Embryogenese der *C. elegans mev-1* Mutante mit FP-Behandlung (50 ppm). Dessen Ablauf des Zellzyklus war vergleichbar zum unbehandelten *C. elegans* WT. Gründerzellen AB, MS, E, C, D und P; Zeitpunkt der Zellteilung in min.

### 3.5 Fluopyram beeinflusst die Morphologie und die Funktion der Mitochondrien in *C. elegans*

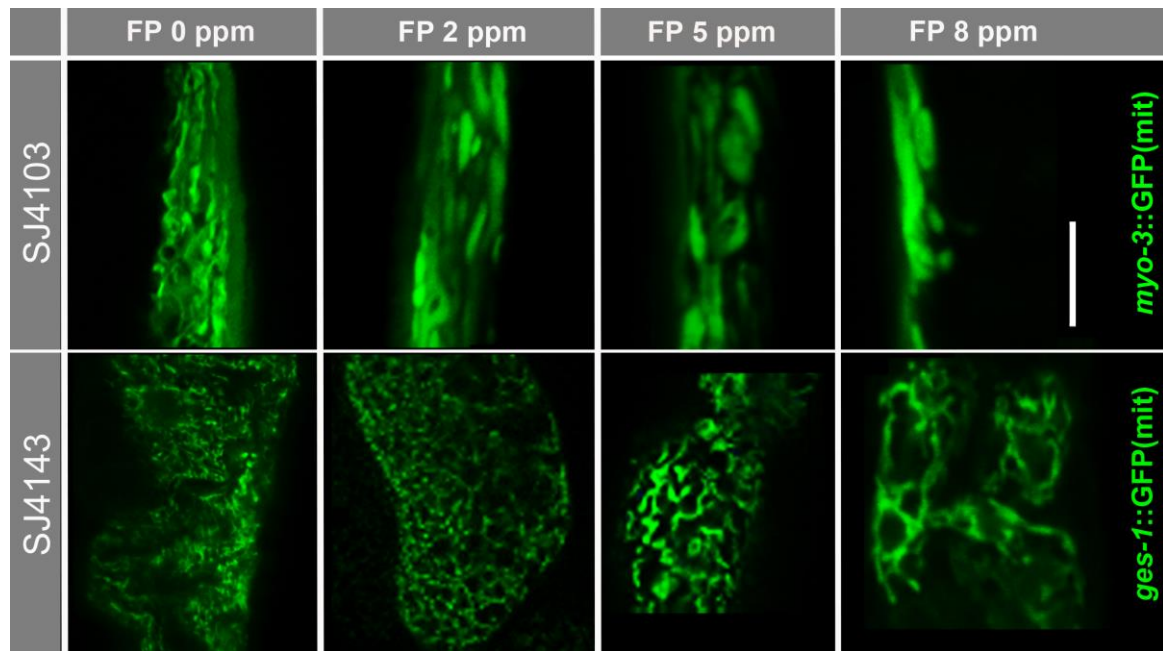
#### 3.5.1 Das mitochondriale Netzwerk der Reporterstämme SJ4103 und SJ4143 verändert sich nach FP-Behandlung

Da die Inhibition der Elektronentransportkette durch FP auch Auswirkungen auf den Aufbau des Mitochondrien-Netzwerks nahelegt, wurde im Folgenden die Wirkung von FP in den stabilen transgenen Linien SJ4103 [*myo-3::GFP(mit)*] und SJ4143 [*ges-1::GFP(mit)*] untersucht (Benedetti et al. 2006). Diese Stämme exprimieren mitochondriales GFP in den Muskelzellen bzw. im Darm von *C. elegans* und ermöglichen so die Betrachtung des Mitochondrien-Netzwerkes in unterschiedlichen Geweben. Diese Zelltypen wurden aufgrund ihres gut organisierten tubulären Netzwerks an Mitochondrien ausgewählt (Abbildung 3-22, FP 0 ppm).

Veränderungen im Aufbau des mitochondrialen Netzwerks wurden mittels konfokaler Laser-Mikroskopie untersucht. Bei steigenden FP-Konzentrationen (2-8 ppm) konnte ein Anschwellen der Mitochondrien im Muskel dokumentiert werden (Abbildung 3-22), so dass aus der ursprünglich netzwerkartigen Struktur schließlich ein großflächiges mitochondriales GFP-Signal entstand (Abbildung 3-22, SJ4103). Eine Veränderung der feinen netzwerkartigen Struktur nach FP-Behandlung konnte auch im Darm des transgenen Stamms SJ4143, jedoch in abgeschwächter Form, nachgewiesen werden (Abbildung 3-22, untere Reihe). Der mitochondriale Phänotyp, dessen Ausprägungsintensität mit steigender FP-Konzentration korreliert, ähnelt einer globulären Form der Veränderung der Mitochondrien, der Hyperfusion (Lu et al. 2011).

Weiterhin wurden darmspezifische Reporterstämme überprüft. Die FP-Behandlung dieser Reporterstämme führte zum selben FP-Effekt (verkürzte Lebensspanne und eine um 90 % reduzierte Nachkommenzahl) wie im WT (Abbildung A-2). Dennoch sind die Expressionsmuster von: Intestinal Filament Organizer (*ifo-1*), Myosin (*myo-3*), F-Aktin (*act-5*), Intermediärfilament Protein B (*ifb-2*) und dem Peptidtransporter (*pept-1*) im Darmepithel von *C. elegans* nach FP-Behandlung korrekt (Daten nicht gezeigt). Dies weist auf die alleinige Veränderung des Netzwerks der GFP-markierten Mitochondrien im Darm und nicht auf eine Veränderung des Darmepithels durch die FP-Behandlung hin.

Anschließend sollte die Morphologie der Mitochondrien genauer untersucht werden. Die Expressionsmuster der mitochondrialen Interaktionspartner *mics-1* und *atad-3* sollten nach FP-Behandlung Aufschluss über die Auswirkung auf die Mitochondrienmorphologie geben.



**Abbildung 3-22 | Analyse des mitochondrialen Netzwerks der *C. elegans* Muskulatur und des Darms bei steigenden Fluopyram-Konzentrationen.**

Dargestellt ist das Fluoreszenz-Signal in der Muskulatur (**obere Reihe**) und im Darm (**untere Reihe**) von Formaldehyd-fixierten *C. elegans*. Dazu wurden abgelegte Embryonen ( $n > 25$ , jeweils) der Reporterstämme SJ4103 [*myo-3::GFP(mit)*] bzw. SJ4143 [*ges-1::GFP(mit)*] jeweils für 7 Tage auf Agarplatten bei verschiedenen FP-Konzentrationen (0-8 ppm) inkubiert. Fluoreszenz-Mikroskopie. Eichstrich 10  $\mu\text{m}$ .

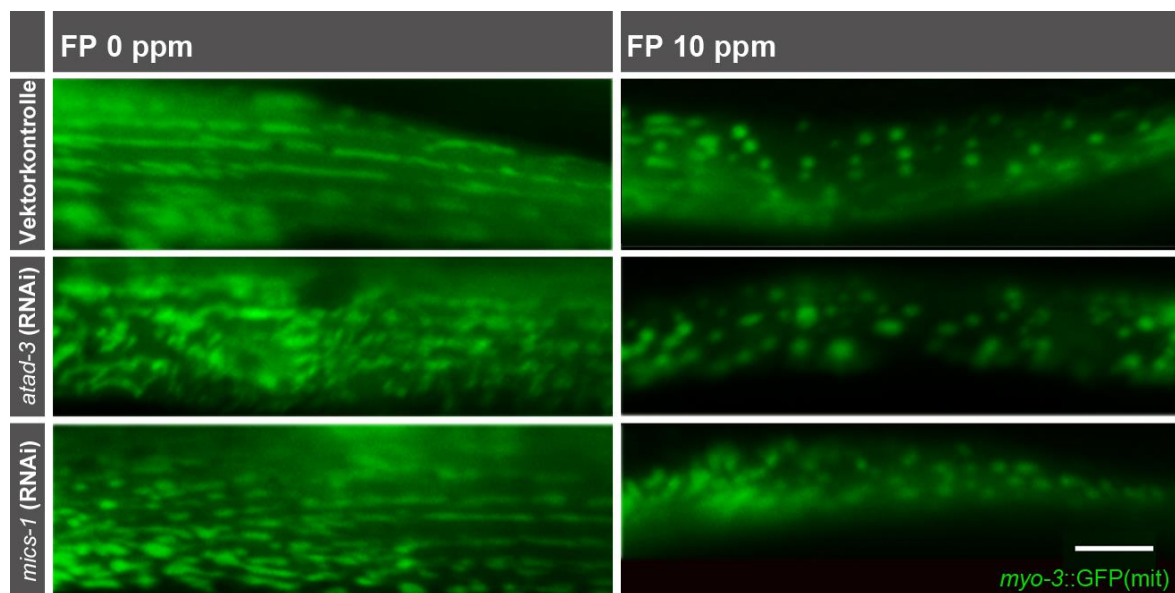
### 3.5.2 RNAi gegen ATAD-3 und MICS-1 schließt diese Proteine als Angriffspunkte von FP aus und weist auf einen übergeordneten Angriffspunkt in der Elektronentransportkette hin

Die mitochondrialen Interaktionspartner ATAD-3, eine ATPase die die Mitochondrienmorphologie aufrecht erhält, und das mitochondriale scaffolding Protein MICS-1 sind aufgrund ihrer Lokalisierung an der äußeren Mitochondrienmembran ein ideales Ziel für Analysen der Morphologie der Mitochondrien-Veränderung, die aus einer FP-Behandlung resultiert (Hoffmann et al. 2012; Hoffmann et al. 2009).

Eine Herunterregulierung der Interaktoren wurde mittels RNAi (durch Fütterung) gegen *atad-3* und *mics-1* in der transgenen Linie SJ4103 [*myo-3::GFP(mit)*], die GFP als Reporter in den Mitochondrien der Muskelzellen exprimiert, durchgeführt.

In SJ4103-Kontrolltieren (gefüttert mit HT115 Bakterien, die die Vektorkontrolle enthielten) bildeten die Mitochondrien in der Muskelschicht ein gut organisiertes und vernetztes System. Nach *atad-3* RNAi und *mics-1* RNAi erschienen die Mitochondrien weniger organisiert und dünner (Abbildung 3-23, links) (Hoffmann et al. 2009). Eine RNAi-Behandlung mit gleichzeitiger FP-Inkubation (10 ppm) führte zu einem Anschwellen der Mitochondrien und einem punktförmigen Erscheinungsbild (Abbildung 3-23, rechts).

Dies entsprach dem Phänotyp der FP-Inkubation ohne gleichzeitige RNAi-Behandlung. Da der Phänotyp nach der FP-Behandlung unabhängig von einer gleichzeitigen RNAi-Behandlung identisch und weder verstärkt noch abgeschwächt war, kann von einer übergeordneten Funktion der FP-Angriffsstelle ausgegangen werden. Hierarchisch betrachtet nehmen alle drei untersuchten Faktoren Einfluss auf das mitochondriale Netzwerk, doch scheint die Wirkungsweise von FP der von *atad-3* und *mics-1* übergeordnet zu sein. Durch elektronenmikroskopische Analysen der Mitochondrien sollten diese Beobachtungen der Veränderung der Mitochondrienmorphologie durch FP-Behandlung detaillierter aufgeklärt werden.



**Abbildung 3-23 | Analyse des mitochondrialen Netzwerks der *C. elegans* Muskulatur nach RNAi mit und ohne Fluopyram-Einfluss.**

Dargestellt ist das *in vivo* Fluoreszenz-Signal von durch Levamisol narkotisierten *C. elegans* SJ4103 [*myo-3::GFP(mit)*] Tieren. RNAi Vektorkontrolle, *atad-3* (RNAi) und *mics-1* (RNAi) Tiere, die ausgehend von L1-Larven (n=10) für 5 Tage entweder auf FP 0 ppm Agarplatten (**linke Spalte**) oder FP 10 ppm Agarplatten (**rechte Spalte**) gehalten wurden. Dabei wurde die *E. coli*-Suspension von HT115 Bakterien jeweils mit FP 10 ppm versetzt. Fluoreszenz-Mikroskopie, Eichstrich 20 µm.

### 3.5.3 Auswirkungen von FP auf die Ultrastruktur der Mitochondrien im *C. elegans* WT und der *mev-1* Mutante

Anhand transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen konnten die Veränderungen der Mitochondrienstruktur nach FP-Behandlung untersucht werden. Da die in den Abschnitten 3.5.1 und 3.5.2 beschriebenen Veränderungen durch FP an den Mitochondrien der Muskelschicht dokumentiert wurden, konzentrierten sich die Untersuchungen auf die mitochondriale Ultrastruktur der Anschnitte der Muskelquadranten. Die Mitochondrien der Muskelzellen sind direkt unter einem Muskelbündel, bestehend aus Sarkomeren, lokalisiert, um den Muskel mit Energie zu versorgen (Abbildung A-3).

Die *C. elegans* WT Mitochondrien der Muskelzellen sind gleichmäßig oval geformt und zeigen eine Aufteilung des Organells in eine äußere und eine innere in Falten (Cristae) gelegte Membran (Abbildung 3-24, B-a; schwarze Pfeile).

Die FP-Behandlung veränderte die Morphologie der Mitochondrien vergleichbar zu den in Punkt 3.5.1 dargestellten Phänotypen konzentrationsabhängig (Abbildung 3-24, A und B). Es zeigten sich Abstufungen in Bezug auf die Intensität der Veränderung. Dokumentiert wurden Mitochondrien mit veränderter Cristae-Struktur bis hin zu globulären und angeschwollenen Mitochondrien. Diese, nach einer FP-Behandlung (8 und 10 ppm) auftretenden Veränderungen der Mitochondrien, waren im *C. elegans* WT und der *mev-1* Mutante ähnlich ausgeprägt. Die Gliederung der mitochondrialen Phänotypen in Stufen erlaubte es, die Veränderungen zu dokumentieren und quantitativ auszuwerten. Zur Quantifizierung der Phänotypen wurden die Mitochondrien nach folgender Charakterisierung klassifiziert: I) Veränderungen der Cristae-Struktur durch Blasen innerhalb derselben (Abbildung 3-24, B-b und f; weiße Pfeile). II) Fusion von Mitochondrien (Abbildung 3-24, B-c und g). III) Geschwollene Mitochondrien, mit fragmentierten Cristae (Abbildung 3-24, B-d und h).

Während im *C. elegans* WT zu 90 % normale wildtypische Mitochondrien auszumachen waren (Abbildung 3-24, A und B-a), führte die Behandlung mit FP 10 ppm im WT überwiegend zu geschwollenen Mitochondrien (zu 70 % bzw. 80 %) und bei 20 % zu einer abnormalen Cristae-Struktur (Abbildung 3-24, A und B-b und d). Bei einer FP-Konzentration von 8 ppm konnten zusätzlich fusionierte Mitochondrien dokumentiert werden (Abbildung 3-24, A und B-c). In der unbehandelten *C. elegans mev-1* Mutante waren über

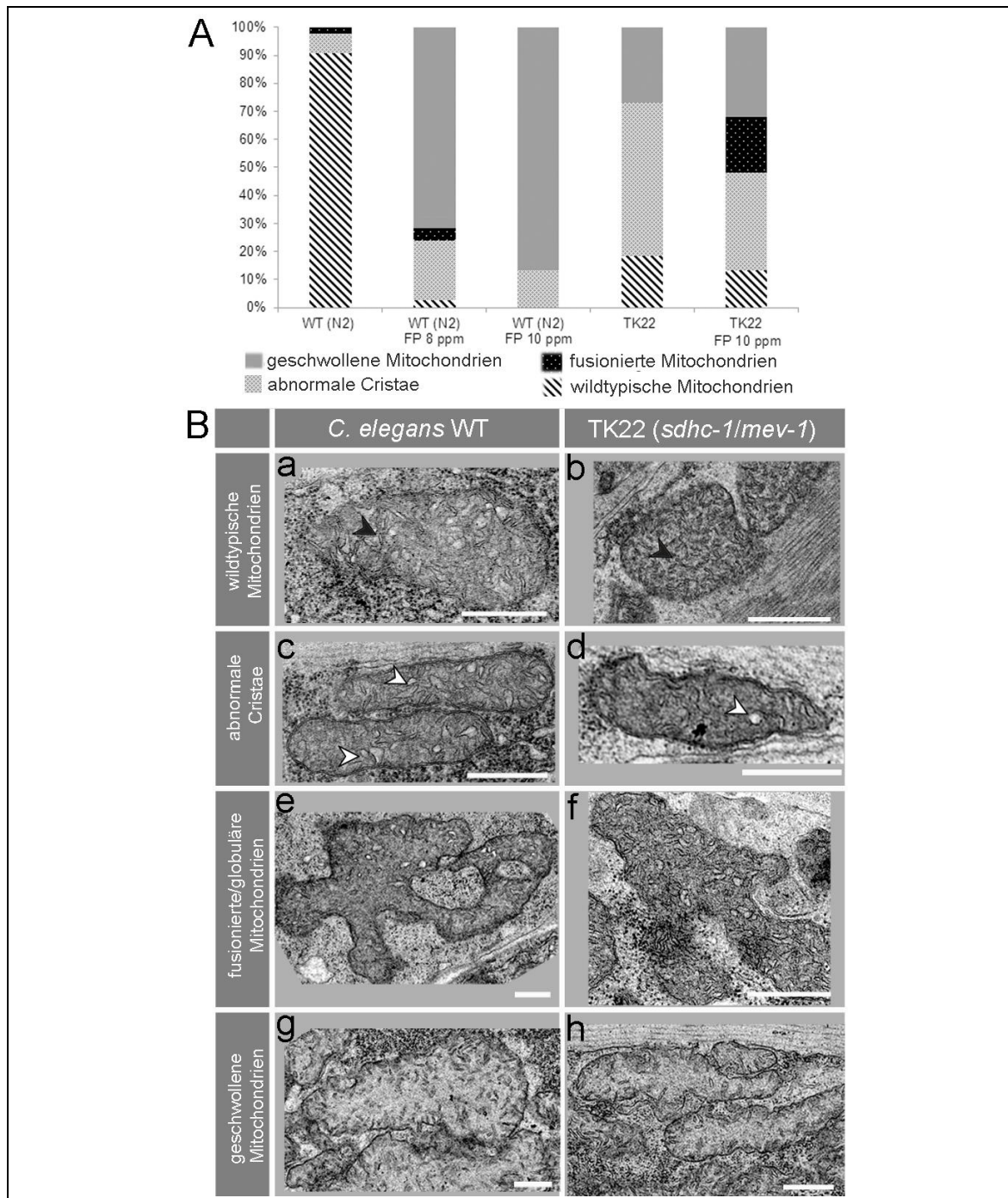


60 % der Mitochondrien geschwollen und 20 % zeigten eine abnormale Cristae-Struktur (Abbildung 3-24, A und B-f und h). Nur 20 % der Mitochondrien hatten einen WT-Phänotyp. Die FP-Behandlung der *C. elegans mev-1* Mutante führte zum zusätzlich Auftreten fusionierter, globulärer Mitochondrien (zu 20 %) (Abbildung 3-24, A und B-g). Der Phänotyp der *C. elegans mev-1* Mutante nach FP-Behandlung war vergleichbar mit den zuvor beobachteten FP-induzierten Mitochondrien-Phänotypen im *C. elegans* WT.

Der gravierendste Mitochondrien-Phänotyp trat in Form von geschwollenen Mitochondrien mit fragmentierten Cristae auf. Dieser Phänotyp der Mitochondrien wird ebenfalls in apoptotischen Zellen beobachtet (Jagasia et al. 2005). Hervorgerufen durch Hypoglykämie konnten fragmentierte Mitochondrien auch in neuronalen nekrotischem Gewebe identifiziert werden (Auer et al. 1985). In Säugerzellen wurde gezeigt, dass das Fragmentieren der Cristae in Mitochondrien im Zusammenhang mit einem geringeren ATP Level auftritt und mit einem Funktionsverlust einhergeht (Rolland et al. 2013).

Der Phänotyp der fusionierten Mitochondrien tritt bei der Behandlung mit subletalen Dosen von FP auf (FP 8 ppm *C. elegans* WT, FP 10 ppm *C. elegans mev-1*). Aus Komplex I Mutanten ist bekannt, dass die Hyperfusion der Aufrechterhaltung der Funktion der Mitochondrien dient (Rolland et al. 2013). Im Vergleich zu letalen FP-Konzentrationen (FP 10 ppm WT), in denen keine Fusion der Mitochondrien zu beobachten war, scheint in subletalen FP-Dosen die Hyperfusion eine mögliche Überlebensstrategie darzustellen. Es wurde gezeigt, dass hyperfusionierte Mitochondrien eine hohe Anzahl an ATP-Synthase Dimeren aufweisen (Gomes et al. 2011). Diese erhöhte Oligomerisierung der ATP-Synthase führt zu einer erhöhten Produktion von ATP als Energiequelle (Strauss et al. 2008). Die Hyperfusion der Mitochondrien führt daher möglicherweise zu einer erhöhten ATP-Produktion.

Die FP-Behandlung führt nachweislich zu einer veränderten Morphologie der Mitochondrien. Der durch die Hemmung von Komplex II induzierte Funktionsverlust könnte durch Mechanismen wie der Fusionierung ausgeglichen werden. Da in der *mev-1* Mutante bereits mitochondriale Veränderungen im unbehandelten Wurm auftraten, könnten diese Phänotypen auf eine Anpassung der reduzierten Succinat-Dehydrogenase-Aktivität hindeuten (Ishii et al. 1998).



**Abbildung 3-24 | Elektronenmikroskopische Analyse mitochondrialer Phänotypen in der Muskulatur adulter Tiere des *C. elegans* WT und der *mev-1* Mutante mit und ohne Fluopyram-Behandlung.**

**A)** Die quantitative Darstellung der verschiedenen mitochondrialen Phänotypen (wildtypisch [a, e], abnormale Cristae [b, f], fusioniert/globulär [c, g] und geschwollen [d, h]) basiert auf der Auszählung von jeweils 100 Mitochondrien in elektronenmikroskopischen Schnitten. Die Schnitte wurden von 4 und 7 Tagen alten Tieren des WT bzw. der *mev-1* Mutante nach Inkubation (Start mit L1-Larven) auf den entsprechenden Agarplatten (ohne und mit FP (8 und 10 ppm)) angefertigt. **B)** Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigen repräsentative Aufnahmen der jeweiligen mitochondrialen Phänotypen, die ohne und mit FP-Behandlung, sowohl im WT als auch in der *mev-1* Mutante, quantitativ unterschiedlich auftraten (siehe A). Weiße Pfeile deuten auf blasenförmige, abnormale Cristae-Strukturen und schwarze Pfeile auf wildtypische Cristae hin. Elektronenmikroskopie (B), 12.000x Vergrößerung, Eichstriche 500 nm.

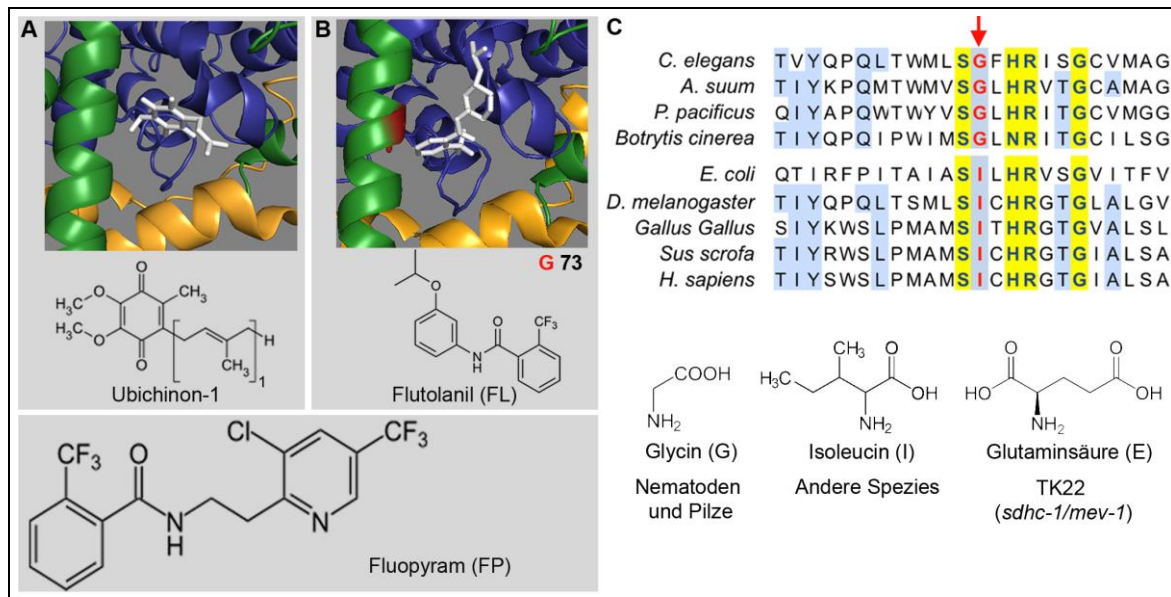
### 3.6 Putative Bindungsstelle von Fluopyram

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass die *C. elegans mev-1* Mutante die FP-Behandlung toleriert. Detaillierte Analysen der Mutation könnten Hinweise auf den Wirkort von FP geben. Die *mev-1* Mutation ist in der SDHC-Untereinheit von Komplex II gelegen, die zusammen mit SDHB und SDHD die Ubichinon-Bindungstasche bildet (Ishii et al. 1990). Die *C. elegans mev-1* Mutante trägt eine Punktmutation (G71E) (Abbildung 3-25, B). In der SDH-Kristallstruktur des Nematoden *A. suum* (5C3J) konnte die Position der Mutation im Aktivitätszentrum von Komplex II lokalisiert werden (Abbildung 3-25, A-B). Die Ubichinon-Bindungstasche ist in der *mev-1* Mutante durch den Austausch von Glycin, das keine Seitenkette trägt, zur Glutaminsäure sterisch verändert bzw. blockiert. Eine Bindung von Ubichinon oder FP, die eine strukturelle Ähnlichkeit aufweisen, ist demnach nur begrenzt möglich (persönliche Mitteilung Peter Lümme, Bayer CropScience, Monheim). Im Folgenden wurden kritische Bindungstaschenreste im konservierten Bereich der Komplex II Untereinheiten untersucht.

#### 3.6.1 In der *C. elegans mev-1* Mutante ist die Ubichinon-Bindestelle in Komplex II der Elektronentransportkette sterisch verändert

Mittels eines Alignments von SDHC-Sequenzen verschiedener Spezies wurde die Position der Mutation von *C. elegans mev-1*, die in einem hochkonservierten Bereich von SDHC liegt, genauer analysiert. Das in Nematoden (*C. elegans*, *A. suum*, *P. pacificus*) existierende Glycin ist nur in Pilzen (hier *B. cinerea*) zu finden, während in den Vertretern der Bakterien (*E. coli*) und Insekten (*D. melanogaster*) sowie Vertebraten (*G. Gallus*, *S. scrofa*, *H. sapiens*) an dieser Position ein Isoleucin (I) lokalisiert ist (Abbildung 3-25, C).

Komplex II von *A. suum* wurde auch mit dem gebundenen Inhibitor Flutolanil kristallisiert (Shimizu et al. 2012; Osanai et al. 2009). Das Flutolanil Molekül ist in der Kristallstruktur von Komplex II in der Ubichinon-Bindungstasche lokalisiert, die von den Untereinheiten SDHB, SDHC und SDHD gebildet wird (Osanai et al. 2009; Inaoka et al. 2015; Sakai et al. 2012). Aufgrund der Strukturähnlichkeit von Flutolanil und FP ist eine Bindung von FP an dieser Intersektion wahrscheinlich. Um die Ubichinon-Bindungstasche und mögliche Konformationsänderungen derselben durch Mutationen im Komplex II zu analysieren, wurden relevante Aminosäurereste phylogenetisch analysiert.



**Abbildung 3-25 | Charakterisierung der Ubichinon-Bindungstasche der Succinat-Dehydrogenase (SDH=Succinat-Ubichinon-Oxidoreductase=Komplex II) an der Intersektion der SDHA-, SDHC- und SDHD-Untereinheiten.**

**A und B)** Dargestellt ist die 3-D-Struktur der Ubichinon-Bindungstasche des Komplex II der Elektronentransportkette in *A. suum* (SDHC-1, grün; SDHB-1, blau; SDHD-1, gelb) entweder besetzt mit Ubichinon (**A**) oder Flutolanil (**B**), beide in weiß (A=5C3J: Inaoka et al. 2015; B=3VRB: Shimizu et al. 2012), die ähnliche Strukturformeln wie FP aufweisen. Bei der rot eingefärbten Aminosäure (**B**) handelt es sich um Glycin an Position 73 der *A. suum* SDHC-Untereinheit (G71, *C. elegans*). **C)** Alignment der Aminosäuren verschiedener SDHC-Untereinheiten um Position G 73 in Nematoden und Pilzen bzw. dem entsprechenden Isoleucin (I) in anderen Spezies.

### 3.6.2 Phylogenetische Analyse der Komplex II-Untereinheiten SDHB, SDHC und SDHD zur Detektion potenzieller alternativer nematodenspezifischer Angriffsstellen für FP

Komplex II der mitochondrialen Elektronentransportkette beherbergt eine Ubichinon Bindungsstelle, die von den Untereinheiten SDHB, SDHC und SDHD gebildet wird (Burns et al. 2015). Inhibitoren dieser Bindungsstelle werden als Fungizide verwendet und sind als Nematizide anwendbar (1.3). Der Komplex II-Inhibitor FP ist gegenüber dem menschlichen und murinen Komplex II insensitiv (Burns et al. 2015). Um diese Selektivität der FP-Wirkung phylogenetisch einzuordnen, wurden die konservierten Regionen der Komplex II-Untereinheiten von Nematoden und Vertebraten auf Sequenzunterschiede untersucht.

Zunächst wurde eine Phylogenie erstellt, die die Position der Mutation der *C. elegans* *mev-1* Mutante (G71E) mit den im Tierreich an dieser Stelle auftretenden Aminosäuren vergleicht (Abbildung A-5). Um weitere prominente Aminosäure-Positionen in den hochkonservierten Bereichen von Komplex II auszumachen, wurden Aminosäurealignments

erstellt. So konnten Positionen identifiziert werden, an denen sich einzig Nematoden und Pilze in ihrer Sequenz gegenüber der Außengruppe unterscheiden. Es wurden 26 Genome analysiert, darunter 14 Nematoden Spezies und 12 Nicht-Nematoden Genome (Vertebrata, Tardigrada, Athropoda, Echinodermata, Chordata und Bakteria; Daten zur Verfügung gestellt von Dr. P. H. Schiffer, University College London). Die *in silico* Sequenzanalyse der zuvor genannten Genome führte zur Identifizierung von Aminosäuren, die lediglich in Nematoden und Pilzspezies vorkommen und mögliche Angriffsstellen für neue Nematizide darstellen könnten (Tabelle 3-2). Neben der bekannten *mev-1* Mutation, in der an Position 71 in Nematoden ein Glycin lokalisiert ist, konnten 14 Aminosäuren identifiziert werden, die in den untersuchten Nematodenspezies konserviert sind. Diese Aminosäuren sind potenzielle neue Angriffsstellen für FP oder andere Succinat-Dehydrogenase-Inhibitoren, die spezifisch in Nematoden wirken sollen.

Tabelle 3-2 | Übersicht der möglichen konservierten Angriffsstellen für Fluopyram in Nematoden und Pilzen im Vergleich zu anderen Spezies.

<i>C. elegans</i> WT Protein	Aminosäure	Position (in der <i>C. elegans</i> Sequenz)
<b><i>SDHB-1</i></b>	L	177
	G	180
<b><i>SDHC-1</i></b>	W	67
	G	71
	C	78
	P	111
	F	118
	F	136
	F	139
	A	142
<b><i>SDHD-1</i></b>	H	84
	D	95
	A	97
	F	138
	E	139

### 3.7 Identifizierung Fluopyram-toleranter Mutanten durch einen EMS Mutagenese Screen

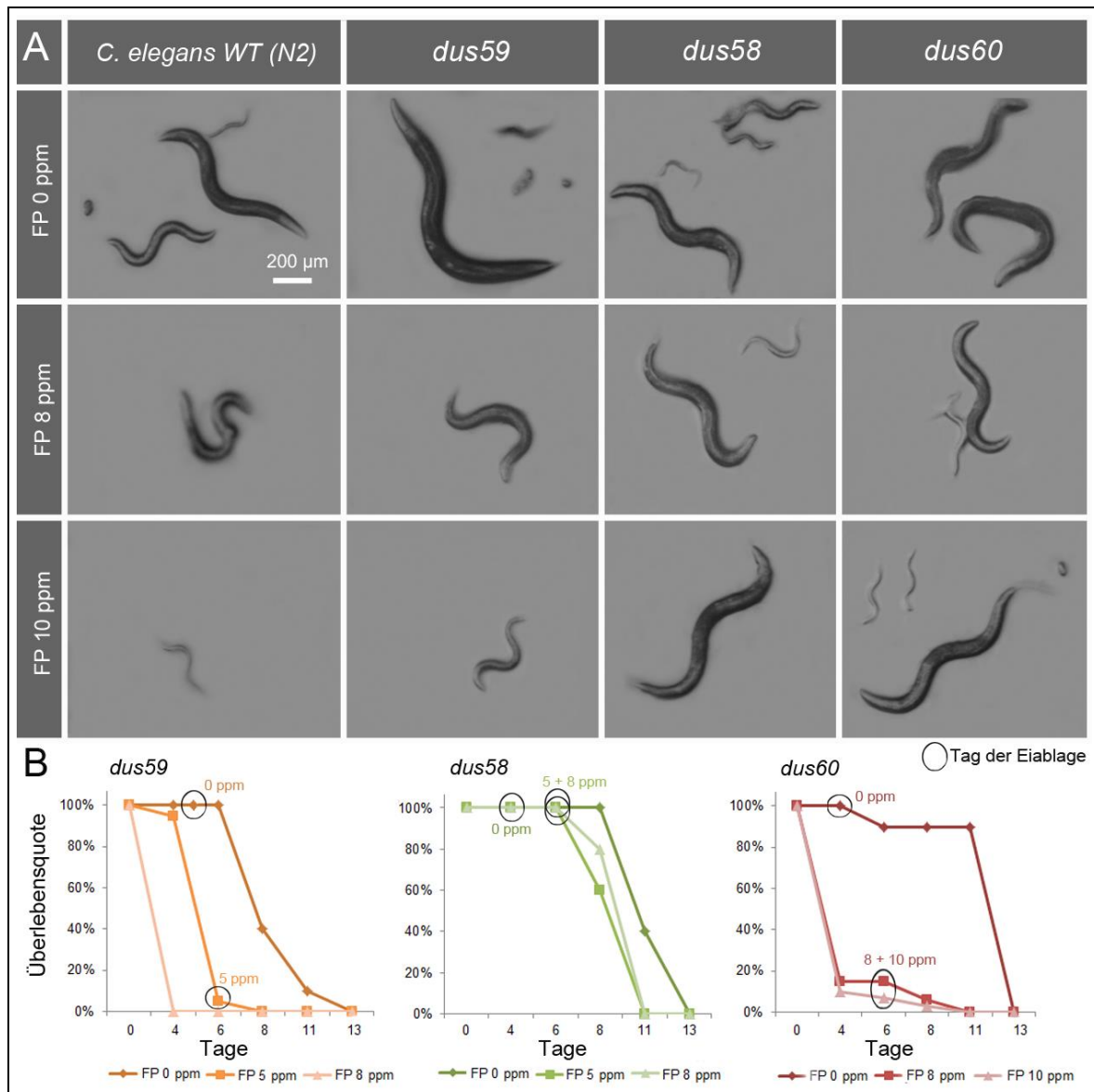
Ein ungerichteter EMS Mutagenese Screen (2.7) wurde durchgeführt, um Mutanten zu identifizieren, die tolerant gegen FP sind. So sollten Gene identifiziert werden, die für weitere Angriffspunkte von FP kodieren. Nach der Behandlung von *C. elegans* WT (P0) mit EMS zur Mutagenese wurde die F2 Generation auf Agarplatten mit FP (8 und 10 ppm) kultiviert, um entsprechend FP-tolerante Mutanten isolieren zu können.

Ein erster Screen mit FP 8 ppm führte zur Identifizierung von zwei Allelen *dus58* und *dus59* in der F2 Generation von 1.000 mutagenisierten F1-Tieren (55%ige Wahrscheinlichkeit eine Mutation im Genom zu generieren). Ein weiterer Screen bei der für den *C. elegans* WT letalen Konzentration von FP 10 ppm identifizierte ein weiteres Allel *dus60* aus der F2 von 800 mutagenisierten F1-Tieren (50%ige Wahrscheinlichkeit eine Mutation im Genom zu erzeugen).

*dus59* Mutanten entwickelten sich bei FP-Konzentrationen  $\leq 5$  ppm zu einem fertilen Adulten, *dus58* tolerierte FP-Konzentrationen bis zu FP 8 ppm (Abbildung 3-26). Einzig *dus60* entwickelte sich bei einer Konzentration von FP 10 ppm zu einem fertilen adulten Wurm (Abbildung 3-26, A).

Die drei neu isolierten *dus* Allele zeichnen sich durch eine verkürzte maximale Lebensspanne (11 Tage) im Vergleich zur Maximal-Lebensspanne des *C. elegans* WT (25 Tage) aus (Abbildung 3-26, B). Eine dauerhafte FP-Inkubation (Start mit Embryonen) der *dus59* (FP 5 ppm) und *dus60* (FP 10 ppm) Allele führt zur Reduktion der Überlebensquote auf ca. 20 %. Trotz der geringen Überlebensquote sind die Würmer jedoch in der Lage Nachkommen zu produzieren (Abbildung 3-26, B). Bei allen *dus* Allelen führte die FP-Behandlung konzentrationsabhängig zu einer verspätet einsetzenden Eiablage (Abbildung 3-26, B) und zu einer um 50 % reduzierten Nachkommenzahl (Daten nicht gezeigt). Die drei isolierten *dus* Allele tolerierten höhere FP-Konzentrationen (5, 8 und 10 ppm) als der *C. elegans* WT (FP 2 ppm) (Abbildung 3-26, B).

Mit Hilfe der neu isolierten FP-resistenten Mutanten sollten im Folgenden weitere potenzielle Angriffsstellen identifiziert werden.



**Abbildung 3-26 | Entwicklung und Lebensspanne neu-isolierter, Fluopyram-resistenter *C. elegans* Mutanten.**

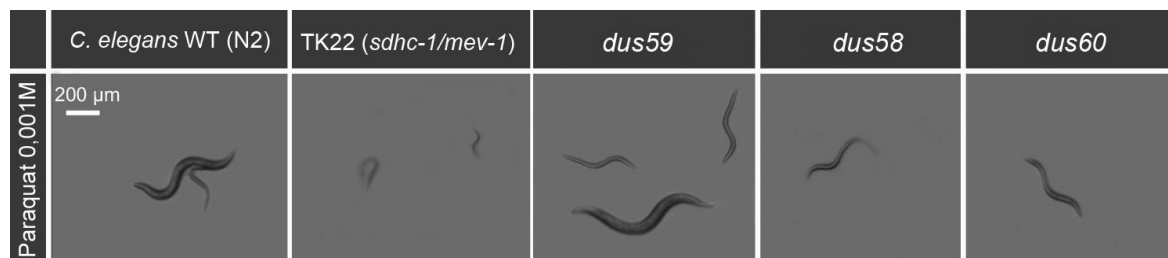
**A)** Dargestellt ist eine Momentaufnahme der Entwicklung (Start mit abgelegten Embryonen) des *C. elegans* WT und der *dus58*, *dus59* und *dus60* Allele FP-resistenter Mutanten nach permanenter Haltung auf Agarplatten für 7 Tage bei FP-Konzentrationen von 0-10 ppm. **Reihe 1)** Adulte Tiere der P0-Generation mit Larven und Embryonen der F1-Generation bei FP 0 ppm. **Reihe 2)** Bei FP 8 ppm, Adulte der P0-Generation und Larven der F1-Generation nur bei *dus58* und *dus60*. **Reihe 3)** Bei FP 10 ppm, F1-Larven nur im Falle von *dus60*. Binokular-Optik, Eichstrich 200 µm. **B)** Lebensspanne der *dus58*, *dus59*, *dus60* Allele FP-resistenter Mutanten bei permanenter Haltung auf Agarplatten bei FP-Konzentration von 0-10 ppm. Die Kreise markieren den Zeitpunkt der ersten Eiablage bei 0 und 5 ppm (*dus59*) bzw. 0, 5 und 8 ppm (*dus58*) sowie 0, 8 und 10 ppm (*dus60*).

Die *C. elegans mev-1* Mutante wurde in einem Methylviologen/Paraquat Hypersensitivitätsscreen isoliert (Ishii et al. 1998). Die Hypersensitivität der *C. elegans mev-1* Mutante gegenüber Paraquat führt durch induzierten oxidativen Stress zu embryonaler Letalität bzw. sofortigem Arrest geschlüpfter Larven im L1-Stadium (Abbildung 3-27). Die Behand-

lung der isolierten Mutanten mit Paraquat sollte Aufschluss über eine möglicherweise identische Lokalisation der Mutation der neu isolierten *dus* Allele geben.

Die drei *dus* Allele zeigten keine zu *C. elegans mev-1* vergleichbare Hypersensitivität gegenüber Paraquat auf Agarplatten (Abbildung 3-27). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich nicht um zu *C. elegans mev-1* identische Mutationen handelt. Die Mutanten *dus58* und *dus60* zeigten eine abgeschwächte Sensitivität gegenüber Paraquat, die sich in einem larvalen Arrest erst im L2/L3-Stadium äußerte (Abbildung 3-27).

Im Gegensatz dazu entwickelte sich die *dus59* Mutante wie der *C. elegans* WT. Um weiterhin eine mögliche Mutation des Komplexes II auszuschließen, wurde die mRNA der *dus* Mutanten isoliert und cDNA synthetisiert. Hieraus wurden die Gene der einzelnen Untereinheiten isoliert und anschließend sequenziert. Es ergaben sich keine Hinweise auf eine Mutation in einer der Komplex II-Untereinheiten (*sdhb-1*, *sdhc-1/mev-1* oder *sdhd-1*) (Abbildung A-4).



**Abbildung 3-27 | Paraquat-Behandlung des *C. elegans* WT, der *mev-1* Mutante und der *dus58*, *dus59* und *dus60* Allele Fluopyram-resistenter Mutanten auf Agarplatten.**

Dargestellt ist eine Momentaufnahme der Entwicklung von abgelegten Embryonen nach 7 Tagen Paraquat-Behandlung. Während im Falle des *C. elegans* WT und *dus59* adulte Tiere mit F1-Generation zu erkennen sind, zeigen *C. elegans mev-1* Larven keine weitere Entwicklung. *dus58* und *dus60* arretieren in einem fortgeschrittenen Larvenstadium. Binokular-Optik, Eichstrich 200 µm.

Eine Genomsequenzierung der neu isolierten Mutanten sollte Aufschluss über die Lokalisierung der Mutation der *dus* Allele geben. Die genomische DNA der Mutanten wurde isoliert und zur Sequenzierung an GATC (Koblenz) übergeben. Die Aufbereitung und Analyse der genomischen Sequenzierungsdaten wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Zunächst wurden die Rohdaten der Genomsequenzierung bezüglich ihrer Qualität analysiert. Das hierfür verwendete Programm Fast QC (2.3.1), das die Reads innerhalb der Sequenzierungsergebnisse ausliest, zeigte eine hohe Qualität der Rohdaten mit einer durch-



schnittlichen Länge von 125 bp per Read auf (Abbildung A-6). Der GC-Anteil innerhalb der Reads betrug 37 %, was mit dem sequenzierten *C. elegans* WT Genom vergleichbar ist (Riddle et al. 1997). Weiterhin sprachen die errechneten Parameter wie Sequenzduplikation, Sequenzinhalt und die Abwesenheit von Adaptoren für gute, zur Assemblierung geeignete Sequenzierungsergebnisse (Abbildung A-7). Die Reads der isolierten Mutanten wurden mit CLC (2.3.1.1) paired end assembliert und zu jeweils ca. 8.000 Contigs zusammengesetzt.

Das Mappen aller Reads gegen das veröffentlichte *C. elegans* Genom (BioProjekt PRJNA13758, Release WS254) generierte Variationen, die von mehreren Reads abgedeckt wurden (Coverage mindestens 40 %) (2.3). Da alle neu isolierten Mutanten gegen denselben Stamm ausgekreuzt wurden, war es möglich gleiche Polymorphismen zu löschen, da diese auf den Hintergrund des Kreuzungsstammes zurückzuführen sind. Hierbei ergaben sich Insertionen von ein bis zwei Basenpaaren sowie Punktmutationen (Tabelle A-1). Nach Abzug der Polymorphismen, die in allen drei Genomen vorhanden waren, erhielt man individuelle Polymorphismen jedes einzelnen Genoms (Minevich et al. 2014).

Nach der Sequenzierung stellte sich die *dus60* Mutante als interessantester Kandidat dar, was mit ihrer bereits gezeigten höherer FP-Toleranz (10 ppm) korreliert. Mögliche Polymorphismen im Genom der neu isolierten *dus60* Mutante weisen auf Mutationen in zwei Untereinheiten von Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette hin: in der Eisen-Schwefel Untereinheit (ISP) sowie der hydrophoben wasserunlöslichen Einheit (HP) (Tsang und Lemire 2003). *nduo-4* (HP) und *nduo-5* (HP) sind in der mitochondrialen DNA lokalisiert, wobei C33A12.1 (ISP) auf Chromosom IV lokalisiert ist. Die in dieser Arbeit bereits analysierte Komplex I-Mutante (3.4) hat eine Mutation in der Flavoprotein Untereinheit dieses Komplexes und ist nicht tolerant gegenüber FP. Da bisher keine Kristallstruktur von Komplex I veröffentlicht wurde, konnte eine genaue Lokalisierung der Mutation in Bezug auf mögliche, resultierende Konformationsänderung nicht untersucht werden.

Des Weiteren konnten, verteilt auf die sequenzierten Mutanten *dus58*, *dus59* und *dus60*, folgende Polymorphismen aufgedeckt werden, die in bereits charakterisierten Genen lokalisiert sind (wormbase.org): Diese sind für den Fettstoffwechsel (F41C6.6, C17G10.7), die Fettregulierung (*lpd-3*), Apoptose und Phagozytose (*klf-1*) sowie für die Gluconeogenese (*pck-1*) essentiell.

Weitere Polymorphismen konnten Genen zugeordnet werden, die eine Rolle bei der Reproduktion spielen. So sind z. B. Gene mutiert, die in der Keimbahn (*fbxa-194*) beziehungsweise während der embryonalen Entwicklung (*trap-2*, Y71F9B.6) exprimiert werden oder auch Transkriptionsfaktoren (*zip-11*) und Kinasen (*old-2*).

Die Analyse der Polymorphismen der neu isolierten Mutanten wies auf diverse Mutationen im Metabolismus des Wurms hin, die zu einer Toleranz gegenüber FP führen könnten. Hierbei stellte die *dus60* Mutante, die bereits zuvor die höchste FP-Toleranz zeigte, mit den gefundenen Mutationen in Komplex I der Elektronentransportkette den vielversprechendsten Kandidaten dar.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Wirkung des Nematizids Fluopyram (FP) auf den Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* detailliert aufgeklärt werden. FP ist in der Lage, die schützende Kutikula des Wurmes sowie die Hülle des Embryos zu passieren und kann auf diese Weise den Lebenszyklus von *C. elegans* konzentrationsabhängig inhibieren. Dies resultiert in einem verlangsamten Lebenszyklus bis hin zum totalen Arrest der Entwicklung sowie in einer von *C. elegans* WT abweichenden Morphologie der Würmer. Mikroskopische Untersuchungen konnten zudem eine veränderte Struktur des mitochondrialen Netzwerks zeigen. Dies weist, unterstützt durch die Analyse der Succinat-Dehydrogenase-Mutante, *C. elegans mev-1*, die resistent gegenüber FP ist, auf einen Angriffspunkt in der mitochondrialen Elektronentransportkette hin. Wahrscheinlich konkurriert FP direkt mit Ubichinon in der Affinität zur Ubichinon-Bindungstasche.

### 4.1 Das Fluopyram-Assay zur Untersuchung an freilebenden Nematoden

Das Assay, das zur Untersuchung der Wirkung von FP an *C. elegans* und auch anderen freilebenden Nematoden entwickelt wurde, ermöglichte es, den FP-Einfluss auf alle Entwicklungsstadien des *C. elegans* WT zu beobachten und FP induzierte Effekte zu dokumentieren. Neben der Verwendung des Agarplatten-Assays zur Beobachtung von Larven (L1-L4) und Adulten konnte im Versuchsansatz auf Objektträgern auch die embryonale Entwicklung auf zellulärer Ebene untersucht werden (3.1). Beide Versuchsansätze des FP-Assays erlaubten sowohl eine dauerhafte FP-Inkubation, als auch eine zeitliche Begrenzung derselben.

Während andere publizierte Assays zur Untersuchung der Wirkstoffaufnahme von *C. elegans* ausschließlich in Flüssigkulturansätzen durchgeführt wurden, was die zusätzliche Applikation von FUDR (Floxuridine) zur Verhinderung der Eiablage der Würmer notwendig macht (Zheng et al. 2013), kann im hier entwickelten Assay darauf verzichtet werden. Dies verhindert das mögliche Auftreten von Effekten durch diese Substanzen jenseits des eigentlichen Versuchsziels, der Analyse der FP-Wirkung.

Des Weiteren erfolgte in anderen Assays im Anschluss an die Wirkstoff-Behandlung in Flüssigkultur (2-3 Tage) die Inkubation auf wirkstofffreien Agarplatten (Moriwaki et al. 2015; Sant’anna et al. 2013). Dies kann möglicherweise zur Abschwächung oder zum vollständigen Verlust eines induzierten Phänotyps führen.

Zheng et al. (2013) zeigten, dass *C. elegans* eine optimale Wirkstoffaufnahme aus NGM-Agarplatten (NGM-Agar Methode) mit abgetöteten Bakterien oder einem Flüssigkulturansatz hat. Die genaue Analyse der FP-Wirkung auf den Lebenszyklus des *C. elegans* WT machte es notwendig, Kulturbedingungen zu wählen, bei denen sich dieser unter wirkstofffreien Konditionen bezüglich der untersuchten Parameter (Dauer der Entwicklungsstadien, Lebensspanne und Anzahl der Nachkommen) so verhält, wie in der Literatur beschrieben. Ein Abweichen dieser Standardparameter der Entwicklung hätte eine Einordnung der Ergebnisse deutlich erschwert. Dies machte es unumgänglich, konträr zu den publizierten optimalen Wirkstoffaufnahme-Bedingungen (Zheng et al. 2013), NGM Agarplatten zu verwenden, die als Futterquelle mit lebenden *E. coli* beimpft wurden. Tote *E. coli* Bakterien als Futterquelle hatten zu einer deutlich reduzierten Zahl der Nachkommen (bereits ohne Wirkstoffgabe) geführt, die eine Interpretation der Ergebnisse des Assays in Bezug zum Lebenszyklus von *C. elegans* WT erschwert hätte (3.1.1). Durch die kontinuierliche Verwendung lebender *E. coli* kann die mögliche geringere Wirkstoffaufnahme vernachlässigt werden, da auch die kritische Wirkstoffkonzentration unter diesen Kulturbedingungen definiert wurde.

Die Verwendung von NGM-Agarplatten erlaubte die Beobachtung aller Stadien der post-embryonalen Entwicklung unter FP-Einfluss sowie die direkte Analyse des Eintretens einer Reaktion auf die FP-Behandlung. So konnte unter Verwendung dieses Assays das Auftreten von zusätzlichen FP-Effekten, wie die Veränderung von Bewegungsabläufen, dokumentiert werden (3.3.4). Diese identifizierten Phänotypen unterstützten die Suche nach potenziellen alternativen Angriffsstellen von FP, die so genauer untersucht werden konnten.

Bei der Interpretation der Ergebnisse des FP-Assay muss jedoch zwingend berücksichtigt werden, dass keine direkten Vergleiche zwischen der Behandlung auf dem Objektträger und auf Agarplatten gezogen werden können. Während auf Agarplatten bei Konzentrationen von FP 10 ppm 50 % der Embryonen schlüpfen, sind es nur 15 % auf dem Objektträger in Flüssigkultur (3.1.2). Es ist davon auszugehen, dass Embryonen auf Objektträgern

durch die vollständige Umspülung mit FP deutlich stärker mit dem Wirkstoff in Kontakt kommen als auf Agarplatten. Hier hat nur der Teil der Oberfläche, der Kontakt zum Agar bzw. zum *E. coli*-Rasen hat, auch direkten Kontakt zu FP.

Des Weiteren muss bei vergleichenden Beobachtungen der Embryogenese auf Objektträgern des *C. elegans* WT und der *C. elegans mev-1* Mutante die deutlich langsamere Entwicklung der Mutante berücksichtigt werden (Ishii, Miyazawa, et al. 2011). Obwohl sich ein *mev-1* Embryo auf einem Objektträger bis zu einer Konzentration von FP 10 ppm zur fertigen Larve entwickelt, ist er nicht in der Lage zu schlüpfen (3.4). Dies könnte durch zusätzlichen Stress hervorgerufen werden, der zum einen aus dem mechanischen Druck durch das Deckglas oder zum anderen aus dem möglichen Sauerstoffmangel durch die Versiegelung des Präparates resultieren könnte. Während des Schlüpfvorganges ist das Pharynxpumpen sowie Enzyme des Darms und der Pharynxdrüsen essentiell (Wood 1988). Die Bildung der Protease, zum Verdau der äußeren Schicht der Eihülle, könnte ebenfalls durch die FP-Behandlung inhibiert sein.

Unter Berücksichtigung der zuvor genannten, durch die Kulturbedingungen möglicherweise auftretenden Nebeneffekte ist das etablierte Assay ein funktionaler Ansatz, um den Einfluss von FP auf den Lebenszyklus von *C. elegans* sowohl während der embryonalen, als auch der postembryonalen Entwicklung zu untersuchen. Darauf aufbauend kann das Assay auch zukünftig mit anderen Wirkstoffen verwendet werden.

## 4.2 Die passive Aufnahme von Fluopyram

### 4.2.1 FP wird nicht nur mit den *E. coli* Bakterien aufgenommen

Das etablierte FP-Assay ermöglichte die Analyse der Aufnahme von FP durch *C. elegans*. Da der Aufnahmemechanismus von FP unbekannt war, sollte zunächst untersucht werden, ob der Wirkstoff gemeinsam mit der Nahrung (*E. coli*) aufgenommen wird, oder ob er die Kutikula des Wurms passiert.

*C. elegans* MT6308 (*eat-4*) und MT6977 (*snt-1*) Mutanten, in denen ein defektes Pharynxpumpen zu kalorischer Restriktion der Würmer führt (Hamilton et al. 2005; Lakowski und Hekimi, 1998), sollten bei einer alleinigen Aufnahme von FP über die Nahrung deutlich toleranter gegenüber FP im Vergleich zum *C. elegans* WT sein. Dies sollte aus einer reduzierten Nahrungsaufnahme resultieren, da sie durch die kalorische Restriktion weni-

ger FP aufnehmen würden. Die FP-Behandlung dieser Mutanten führte zu einem frühen larvalen Arrest in subletalen Konzentrationen (3.3.1), was auf eine stärkere Sensitivität gegenüber FP schließen lässt. Eine Aufnahme von FP einzig über die Nahrung kann somit ausgeschlossen werden. Die vollständige Inhibition der Nahrungsaufnahme durch kältebedingte Paralyse (3.3.1) unterstützt die Hypothese der nicht allein über den Darm stattfindenden Aufnahme von FP.

Die alleinige Aufnahme von FP in Kombination mit Bakterien über die Nahrung kann aufgrund der durchgeführten Untersuchungen ausgeschlossen werden. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass es sich bei FP um einen Stoff handelt, der die Kutikula und auch die Eihülle von *C. elegans* passieren kann.

#### 4.2.2 FP kann die Kutikula und die Hülle des Embryos von *C. elegans* passieren

Die Kutikula der *C. elegans* WT Larven und des adulten Wurms sowie die Eihülle des Embryos stellen eine sehr schlecht permeable Barriere und somit einen wirkungsvollen Schutz gegenüber Umwelteinflüssen dar (Olson et al. 2012; Stein und Golden, 2015). Da gezeigt werden konnte, dass die Inkubation mit FP Auswirkungen auf den Embryo hat und die FP-Aufnahme von Larven und Adulten nicht ausschließlich über die Nahrung erfolgen kann, wurde die Möglichkeit einer Permeabilität der schützenden Barriere gegenüber FP in Betracht gezogen. Dies konnte sowohl für die trilaminäre Eihülle, als auch für die kollagene Kutikula der Larven und Adulten bestätigt werden (3.2.2). Die schützende Hülle, die den Embryo umgibt, ist jedoch erst bei deutlich höheren Konzentrationen von FP im Vergleich zur Kutikula der Larve permeabel. Stoffe, die in der Lage sind die Kutikula zu passieren, müssen eine hohe Lipidlöslichkeit aufweisen und klein sein (Burns et al. 2015). Dies spricht für eine Permeabilität der Kutikula gegenüber FP. Der genaue Mechanismus, wie FP die Eihülle, bzw. die Kutikula, passiert bleibt jedoch ungeklärt.

Der Aufbau der larvalen Kutikula des *C. elegans* WT ist in allen Stadien ähnlich (Abbildung 1-3), sodass zu erwarten war, dass FP die Kutikula jedes Larvenstadiums passieren kann und keine Unterschiede der FP-Toleranz zwischen den Larvenstadien auftreten. Auch die dreischichtige kollagene Kutikula des adulten Wurms, die von der darunterliegenden Hypodermis gebildet wird, gilt wie die Eihülle als schlecht permeable Barriere (Page et al.

2014; Francis und Waterston 1985). Trotzdem ist diese, wie auch die larvale Kutikula permeabel für FP.

Für die Aufnahme des Wirkstoffs über die Kutikula spricht zudem die schnell eintretende Wirkung von FP (Abbildung 3-3, B). Die Aufnahme über die Kutikula führt zu einer schnellen Verteilung in der Körperhöhle von *C. elegans*. Eine langsamere Aufnahme über den Verdauungstrakt würde zunächst die Einlagerung des Wirkstoffes in die Darmzellen erforderlich machen, um zu einer anschließenden Verteilung in der Körperhöhle zu führen (Kaletta und Hengartner 2006). Besonders die schnell auftretende Veränderung des mitochondrialen Netzwerks nach FP-Inkubation in den Muskelzellen (3.5), die direkt an die Kutikula grenzen, unterstützt die Vermutung, dass von einer Aufnahme von FP über die Kutikula auszugehen ist.

Die Tatsache, dass Kutikulakollagen-Mutanten, wie die links-ROLLER (*rol-3* und *rol-8*) oder Dumpy Mutanten (*dpy-2* und *dpy-10*), die eine fehlerhaft aufgebaute Kutikula besitzen, sensitiver auf die Behandlung im FP-Assay reagieren, und einen Arrest bereits in subletalen Konzentrationen zeigen (Abbildung 3-18), deutet ebenfalls auf eine Aufnahme über die Kutikula hin. Da gezeigt werden konnte, dass die Beschaffenheit der Kutikula eine entscheidende Rolle in der Ausprägung der Wirkung von FP einnimmt, ist davon auszugehen, dass die Passage der Kutikula der Hauptaufnahmeweg von FP ist. Weder die Eihülle noch die Kutikula der Larven und des adulten Wurms, die als schwer permeabel gelten, wehren den lipophilen Wirkstoff FP ab. Ein möglicher alternativer Angriffspunkt von FP könnte in der Kutikula liegen und deren korrekte Zusammensetzung verhindern. Raster-elektronenmikroskopische Analysen haben eine Veränderung der äußeren Morphologie nach FP-Inkubation gezeigt (3.3.4). Diese könnte auf einen inkonstanten hydrostatischen Druck im Wurm hindeuten, der wiederum aus einer unter FP-Einfluss fehlerhaft aufgebauten Kutikula resultieren könnte.

Siwik et al. (2001) konnten weiterhin zeigen, dass oxidativer Stress Metalloproteasen zur Degradierung von Kollagen in Fibroblasten der Ratte aktiviert. Dies suggeriert, dass oxidativer Stress durch die FP-Behandlung zur Degradierung der Kollagenproteine und somit zu einer ungeordneten Kutikulakollagen-Biosynthese führt (Bito et al. 2017).

### 4.3 Die kritische FP-Konzentration für den freilebenden Nematoden *C. elegans* ist abhängig vom Entwicklungsstadium

Die Auswirkungen von FP auf die embryonale und larvale Entwicklung wurden in Form der kritischen Konzentrationen und der daraus resultierenden Hemmung der Entwicklung bestimmt (3.2). Es konnte gezeigt werden, dass FP die embryonale und larvale Entwicklung des *C. elegans* WT konzentrationsabhängig inhibiert. Die kritische FP-Konzentration, die zu einem Arrest der Entwicklung führt, liegt bei Embryonen  $\geq 6$  ppm (in Flüssigkultur auf Objektträgern) und bei Larven (Start mit L1)  $\geq 3$  ppm (auf Agarplatten).

Die Ergebnisse zeigen, dass die FP-Behandlung und deren Auswirkungen konzentrationsabhängig sind. Embryonen, die mit FP-Konzentrationen  $\geq 6$  ppm inkubiert wurden, zeigen embryonale Letalität. Allerdings ist die Zeitspanne, bis dieser FP-induzierte Effekt einsetzt konzentrationsabhängig. So konnten Embryonen, die mit FP 6 ppm inkubiert wurden, ihre Entwicklung noch teilweise fortführen und erreichten Morphogenesestadien (3.2.1), in denen sie arretierten. FP-Konzentrationen  $\geq 8$  ppm führten dazu, dass der Arrest bereits während, oder bei höheren Konzentration (FP 50 ppm) vor, der Gastrulation dokumentiert werden konnte. Dieser konzentrationsabhängige embryonale Entwicklungsarrest deutet darauf hin, dass zur vollständigen Hemmung der Entwicklung eine definierte Menge an FP aufgenommen werden muss. Diese wird bei höher konzentrierten Inkubations-suspensionen schneller erreicht, was so zu einem Entwicklungsarrest führen könnte. Eine vergleichbare konzentrationsabhängige Potenzierung der negativen Effekte konnte auch für die postembryonale Entwicklung gezeigt werden.

Die Behandlung mit FP-Konzentrationen von 5-6 ppm führte zu einem larvalen Arrest, der einem L3-Stadium entspricht, identifiziert durch die fehlende Ausbildung der Vulva (Abbildung A-1). Dieser Arrest im L3-Stadium könnte durch einen energie-sensorischen Mechanismus hervorgerufen sein, der als Entwicklungskontrollpunkt in diesem Stadium dient und bei dem die Elektronentransportkette die entscheidende Rolle spielt (Tsang und Lemire, 2003). L1-Larven, die mit FP-Konzentration  $\geq 8$  ppm inkubiert werden, arretieren jedoch bereits im L2- bzw. L3-Stadium. Die Definition von FP 2 ppm als subletale und FP 10 ppm als letale Konzentration erlaubte es, eine identische FP-Dosierung im Hinblick auf die kritische Konzentration bei Embryonen und Larven zu nutzen. Die Ermittlung der kritischen Konzentration erlaubte zudem einen Vergleich mit den FP-



Konzentrationen, die bereits an Pflanzenparasiten unter Laborbedingungen und auf dem Feld angewendet werden. Das Mobilitäts-Assay konnte die Wirkung von FP auf Parasiten mit der auf den *C. elegans* WT vergleichen. Bei einer FP-Behandlung (20 ppm) im Flüssigkulturansatz tritt die Paralyse bei den Parasiten *M. incognita* und *Radophylus similis* bereits nach 2 h bzw. 1 h ein (persönliche Mitteilung Peter Lümme, Bayer CropScience, Monheim). Im Vergleich dazu wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass bei einer Konzentration von 20 ppm eine 4 h Inkubation erfolgen muss, um im *C. elegans* WT eine Paralyse zu bewirken (3.1.2). Dies spricht für eine höhere FP-Toleranz von *C. elegans* verglichen mit den untersuchten Pflanzenparasiten.

Die empfohlene Felddrate zur Anwendung des FP-haltigen Nematizids 'Idemnify', das in der kommerziellen Landwirtschaft gegen gallenbildende Rasen-Nematoden angewendet wird, beträgt 400 g/l pro 1.000 m<sup>2</sup>. Dies entspricht einer Konzentration von etwa 1,1 ppm und ist somit deutlich geringer als die in dieser Arbeit als subletal für *C. elegans* WT definierte Konzentration (Baird et al. 2016). Für 'Velum Prime' und 'Luna Privilege', die ebenfalls beim Befall mit pflanzenparasitären Nematoden eingesetzt werden, ist die empfohlene Dosierung 500 g/l pro 10.000 m<sup>2</sup> Feld (Broeksma et al. 2014). Diese Anwendung entspricht einer FP-Konzentration von 0,14 ppm, einer fast um den Faktor 100 reduzierten Konzentration verglichen mit der hier definierten letalen Konzentration für den *C. elegans* WT.

Die Konzentrationen, die auf dem Feld zur Bekämpfung pflanzenparasitärer Nematoden angewendet werden, sind demzufolge bereits in wesentlich geringeren Konzentrationen als den hier angewandten letalen Konzentrationen wirkungsvoll. Diese Konzentrationen würden den Lebenszyklus von *C. elegans* nicht hemmen. Parasiten weisen im Vergleich zu *C. elegans* jedoch eine geringere Toleranz gegenüber FP auf (Faske und Hurd 2015). Die in dieser Arbeit behandelten parthenogenetischen, freilebenden Nematoden zeigen ebenfalls einen larvalen Arrest bei FP 2 ppm, was für einen Zusammenhang zwischen einer geringeren FP-Toleranz und dem parthenogenetischen Fortpflanzungsmodus spricht (3.2.5). Da auch die meisten der pflanzenparasitischen *Meloidogyne* Spezies parthenogenetisch sind, könnte dies die geringeren Anwendungskonzentrationen erklären. Auch die deutlich längere FP-Behandlung im Feld, verglichen mit der im FP-Assay, könnte einen Einfluss auf die Verringerung der notwendigen FP-Menge haben. Es ist zu erwarten, dass die hier ermittelten Konzentrationen, die für *C. elegans* letal oder subletal sind, auch auf

freilebende parasitäre Nematoden angewendet werden können, da diese wie beschrieben eine offenbar geringere Toleranz gegenüber FP haben. Wahrscheinlich genügen bereits deutlich geringere Konzentrationen. Es ist eher unwahrscheinlich, dass an *C. elegans* ermittelte Wirkstoffkonzentrationen für die landwirtschaftliche Nutzung zu gering sind. Dies macht *C. elegans* zu einem idealen, leicht zu kultivierenden Modell, um unter Laborbedingungen neue nematizide Wirkstoffe zu testen und so die kritischen Konzentrationen einzugrenzen, bevor diese an den deutlich schwieriger zu haltenden Pflanzenparasiten getestet werden.

#### 4.4 Reversibilität der Fluopyram-Wirkung

Der Lebenszyklus des *C. elegans* WT kann durch FP-Inkubation in allen Entwicklungsstadien arretiert werden. Abhängig von Dauer und Konzentration der Behandlung ist dieser Arrest teilweise reversibel (3.2.4). Ein kurzer Puls in letalen Konzentrationen (FP 10 ppm) ist sowohl für Larven als auch Embryonen reversibel, führt jedoch zu einer geringeren Nachkommenzahl in der nächsten Generation. Diese Beobachtungen stimmen mit bereits publizierten Auswirkungen eines larvalen Arrests überein. So führt ein larvaler Arrest, der durch unterschiedliche Stressfaktoren induziert sein kann, in der F1-Generation zu reduzierter Fruchtbarkeit und Defekten in der Nahrungsaufnahme (Jobson et al. 2015). Der reversible larvale Arrest scheint also unabhängig von der Art seiner Induktion (Stress durch kalorische Restriktion oder Wirkstoffe) immer einen Einfluss auf die Fertilität zu haben. Die Reversibilität der FP-induzierten Paralyse konnte auch für die Pflanzenparasiten *M. incognita* und *R. reniformis* gezeigt werden (Faske und Hurd 2015).

Eine kurze Pulsbehandlung mit FP 50 ppm ist bei Embryonen irreversibel und führt zum vollständigen Arrest der Entwicklung. Bei Larven ist die Behandlung mit letalen Konzentrationen (FP 10 ppm) nach einer Dauer von 6 Tagen nicht reversibel (bei 90 % der Larven) und führt zur Letalität (3.2.4).

Ein möglicher Grund dieser Irreversibilität könnte die Wirkung von FP auf die Mitochondrien sein. FP inhibiert Komplex II der Elektronentransportkette, was zur Schädigung und einer daraus resultierenden Veränderung der Morphologie der Mitochondrien führt. In fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die FP-Inkubation zum Anschwellen und zur Fusion der Mitochondrien führt (3.4). Außerdem

konnte eine Fragmentierung der Cristae dokumentiert werden, die wahrscheinlich auf einen veränderten Energiemetabolismus zurückzuführen ist und eine irreversible Schädigung der Mitochondrien nahelegt (Quirós et al. 2016). Fragmentierung wurde bereits bei beschädigten Mitochondrien beschrieben, wie sie z. B. in apoptotischen Zellen von Säugerzellen vorkommen (Wang 2001). Weiterhin könnte auch die Dauer des FP-induzierten larvalen Arrests zur Irreversibilität der selbigen führen (Jobson et al. 2015).

In den Darmzellen konnte eine Veränderung der Mitochondrienmorphologie als Reaktion auf die FP-Behandlung gezeigt werden (Abbildung 3-22), jedoch zeigte die Expression apikaler Proteine (IFB-2, PEPT-1, IFO-1 und ACT-5) im Darmepithel keine Veränderung (3.3.1). Dies spricht für eine Wirkung von FP in den Darmzellen einzig an den Mitochondrien ohne Auswirkungen auf das Darmepithel und somit dafür, dass das Mitochondrium den Hauptangriffspunkt für FP in der Zelle darstellt.

Die durch FP hervorgerufenen Schäden der Mitochondrien führen durch Inhibition der Elektronentransportkette zu oxidativem Stress in den betroffenen Zellen, was mit altersbedingten Veränderungen vergleichbar ist. Die Akkumulation solcher altersbedingter Schäden, hervorgerufen durch oxidativen Stress, sind ebenfalls irreversibel (Yang und Hekimi 2010).

#### 4.5 Identifikation alternativer Angriffsstellen von Fluopyram durch die Isolierung neuer Mutanten

Um die FP-induzierten Effekte weiter zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit neue FP-resistente *C. elegans* Mutanten isoliert. Eine genaue Lokalisation der Mutationen und die daraus resultierende Identifikation der betroffenen Gene sollte die genaue Wirkungsweise von FP detailliert aufklären und Rückschlüsse auf die natürliche Ausbildung von Resistenzen in parasitären Nematoden erlauben. Die identifizierten *dus* Allele zeigen eine Resistenz gegenüber für den *C. elegans* WT letalen FP-Konzentrationen (3.7). Durch die Genomsequenzierung wurden die Mutationen lokalisiert und charakterisiert. Durch die Analyse von Polymorphismen ergaben sich Kandidaten-Gene, die einen Hinweis auf den genauen Wirkort von FP liefern könnten.

Im Genom der neu isolierten *dus60* Mutante konnten Polymorphismen im Komplex I der Elektronentransportkette gezeigt werden. Dies deutet auf einen veränderten Ablauf der

Elektronentransportkette hin, was zu einer abgeschwächten Wirkung von FP auf Komplex II führen könnte (3.7). In der *dus60* Mutante könnte möglicherweise ein hypermorpher Komplex I die FP-Inhibition des Komplexes II kompensieren, da beide Komplexe an der Einspeisung von Elektronen in die Elektronentransportkette beteiligt sind (Rea und Johnson 2003). Weitere identifizierte Polymorphismen in den Genen H37A05.4 (*dus60*), *oac-4* (*dus59*) und Y51H4A.2 (*dus58*) (Tabelle A-1) der neu isolierten *dus* Allele sind bereits in anderen Mutagenese-Screens bezüglich ihrer Nematizid-Resistenz identifiziert worden (Burns et al. 2015).

Die durch Polymorphismen identifizierten mutierten Gene der *dus58*, *dus59* und *dus60* Allele spielen eine Rolle im Metabolismus, der Reproduktion und der Stressantwort des Wurms. In den neu isolierten Allelen könnte eine Mutation vorliegen, die den Metabolismus des Wurms beeinflusst. Dies könnte dazu führen, dass FP in den *dus* Allelen durch veränderte Stoffwechselprozesse weniger wirksam ist als im WT.

Überdies ist eine Veränderung der Fettspeicherung ein FP-Effekt, der auf eine veränderte Energiegewinnung hinweist (3.3.2). Es ist bekannt, dass SDHC Mutanten ihre Energiegewinnung durch vermehrte Glykolyse und erhöhte Mengen an Bestandteilen des Tricarbonsäure-Zyklus beziehen (Ishii, Miyazawa, et al. 2011; Butler et al. 2013). So könnte eine Mutation des Fettstoffwechsels oder die Hyperfusion der Mitochondrien einen weiteren Vorteil für eine FP-Resistenz bedeuten. Ähnliche Anpassungen an die veränderten Funktionen der Elektronentransportkette konnten hier für die *C. elegans mev-1* Mutante gezeigt werden.

Zur Bestimmung des genauen Wirkortes soll im Folgenden eine Lokalisierung der Mutationen durch SNP-Kartierung auf die einzelnen Chromosomen erfolgen. Diese Genotypisierung könnte eine spezifische Stelle im Genom markieren und so die aus der Genomsequenzierung identifizierten Kandidatengene verifizieren. Des Weiteren könnte eine Herunterregulierung der Kandidatengene durch RNAi bei der Aufklärung möglicher Angriffspunkte von FP hilfreich sein. Auch ein erneuter Screen, der vollständig gesättigt ist, würde für die abschließende Aufklärung des FP-Wirkortes notwendig sein.

## 4.6 Die Elektronentransportkette als Angriffspunkt für Fluopyram auch in Nematoden?

FP wirkt als Succinat-Dehydrogenase-Inhibitor durch eine Reduktion der Komplex II-Aktivität in der mitochondrialen Elektronentransportkette (Zhang et al. 2014). Für Pilze war dieser Wirkmechanismus bekannt, weshalb FP kommerziell als Fungizid verwendet wird. Ein erster Hinweis auf einen identischen Wirkort in Nematoden lieferte die Analyse der *C. elegans mev-1* Mutante. Da diese eine deutlich höhere FP-Toleranz als der *C. elegans* WT aufweist, ist es sehr wahrscheinlich, dass die in Komplex II lokalisierte Mutation die FP-Bindung beeinflusst. Genauere Sequenz- und 3-D-Strukturanalysen deuten darauf hin, dass der durch eine Punktmutation induzierte Aminosäureaustausch von Glycin zu Glutaminsäure zu einer Veränderung der Ubichinon-Bindungstasche und somit dem wahrscheinlichen Angriffspunkt von FP führt (Abbildung 3-25, A). Im Gegensatz zu Glycin im WT ist die Seitenkette der Glutaminsäure, die in die Ubichinon-Bindungstasche ragt und diese so möglicherweise blockiert, lipophil und negativ geladen. Mit der sterischen Veränderung der Bindungstasche könnte eine mögliche FP-Resistenz einhergehen, da die fehlende Bindungsmöglichkeit von FP in der Ubichinon-Bindungstasche blockiert ist.

Die *in vitro* Analyse der Affinität von FP zum aufgereinigten Komplex II konnte eine deutlich reduzierte Affinität in der *mev-1* Mutante zeigen. Die Ermittlung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität erlaubte die Bestimmung der FP-Inhibitionskonstanten ( $K_i$ -Wert) von 0,6 nM für den WT und von 7,2 nM für die *mev-1* Mutante. Der kleine  $K_i$ -Wert des WT spricht für eine stattfindende Inhibition von Komplex II durch FP. Die weitere Analyse des Komplex II der *mev-1* Mutante konnte keine Affinität von FP bei Konzentrationen von 0,1 bis 90 nM zu Komplex II der *mev-1* Mutante zeigen (Persönliche Kommunikation Peter Lümme, Bayer CropScience, Monheim).

Der Austausch einer einzigen Aminosäure in der *C. elegans mev-1* Mutante scheint die FP-Affinität stark zu reduzieren. Die Ubichinon-Bindung ist wahrscheinlich ebenfalls betroffen, was die reduzierte Komplex II-Aktivität der *C. elegans mev-1* Mutante erklären könnte (Ishii, Miyazawa, et al. 2011).

Sowohl eine Mutation, als auch eine Inhibition der Succinat-Dehydrogenase führen zu erhöhten ROS-Leveln, die durch ein vermehrtes Vorkommen von Succinat in der mito-

chondrialen Matrix sowie entweichenden Elektronen produziert werden. Die verminderte Aktivität von Komplex II wirkt sich auch auf die ROS-Produktion von Komplex I und III aus (Dröse 2013). Das erhöhte Vorkommen von ROS in den Mitochondrien führt dort zunächst zur Schädigung der mitochondrialen DNA und langfristig zur Funktionsstörung der Mitochondrien (Vendelbo und Nair 2011). Eine solche mögliche Änderung der Funktion der Mitochondrien konnte als Folge der FP-Behandlung durch eine veränderte Morphologie dokumentiert werden (3.5). Im *C. elegans* WT führt eine fehlerhafte Morphologie der Mitochondrien zum Arrest der embryonalen und larvalen Entwicklung (Rolland et al. 2013). In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass der Funktionsverlust eines der Komplexe der Elektronentransportkette zur Fragmentierung der Mitochondrien führt (Guillery et al. 2008; Liot et al. 2009). Auch in dieser Arbeit konnte eine Fragmentierung der Mitochondrien und ein möglicherweise dadurch induzierter Arrest der larvalen Entwicklung dokumentiert werden (3.5). Weiterhin konnte in der *C. elegans mev-1* Mutante, die eine Punktmutation im Komplex II aufweist, eine Hyperfusion der Mitochondrien gezeigt werden (3.5). Dies könnte auf eine mögliche Anpassung der Energiegewinnung hindeuten. Der Versuch der Funktionserhaltung der Mitochondrien durch Fusion ist bereits für Komplex IV Mutanten bekannt (Rolland et al. 2013). Dies spricht für die Mitochondrien als Wirk- und Angriffsort von FP.

Der in den Mitochondrien lokalisierte Komplex II der Elektronentransportkette ist sehr wahrscheinlich der Angriffsort von FP. Die FP-induzierte Komplex II-Inhibition führt wahrscheinlich zu unterschiedlichen Phänotypen, wie z. B. zur veränderten Form der Mitochondrien oder fehlerhaftem Aufbau der Kutikula. Der durch die FP-Inhibition der Elektronentransportkette induzierte oxidative Stress könnte zu einer fehlerhaften Kollagen-Biosynthese führen (Siwik et al. 2001; Bito et al. 2017).

Allerdings können auch zusätzliche Angriffsorte von FP nicht ausgeschlossen werden. So lassen die Veränderungen der Kutikula und der Bewegungsmuster nach permanenter FP-Behandlung sowie die Sensitivität von Kutikula-Mutanten einen möglichen alternativen Angriffspunkt von FP in Komponenten der Kutikula vermuten (3.3.3 und 3.3.4). Die identifizierten Polymorphismen in Komplex I der Elektronentransportkette der neu isolierten *dus* Allele sind ein mögliches weiteres Ziel für FP in *C. elegans* (3.7). Zudem konnte in RNAi-Experimenten (*let-413*, *dlg-1*) bei gleichzeitiger FP-Behandlung kein FP-Effekt (Arrest der Entwicklung) dokumentiert werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde der

RNAi-Effekt abgeschwächt. Dies lässt auf ein mögliches alternatives Ziel von FP in der RNAi-Maschinerie schließen. Alternative Wirkorte für FP, außerhalb von Komplex II, sind damit wahrscheinlich.

#### 4.6.1 Konservierte Aminosäuren haben einen Einfluss auf die Ubichinon-Bindestelle als Angriffsort von FP

FP blockiert als Succinat-Dehydrogenase-Inhibitor den Komplex II der Elektronentransportkette. Es hat eine hohe Affinität zur Ubichinon-Bindungsstelle, die an der Schnittstelle der Untereinheiten SDHB, SDHC und SDHD liegt (Iverson 2013). Burns et al. (2015) identifizierten den Komplex II als einen Hauptangriffspunkt von Inhibitoren der Elektronentransportkette. Moleküle, die besonders wirksame Elektronentransportketten-Inhibitoren sind, wurden als klein und lipophil beschrieben und gelten als besonders effektive Nematizide. Es wurden 33 nematizid-resistente Mutanten (10 in *sdhb-1*, 16 in *sdhc-1*, 6 in *sdhd-1*) identifiziert, deren Mutationen alle in der Ubichinon-Bindestelle von Komplex II lokalisiert sind (Burns et al. 2015).

Die hier gezeigten 3-D-Strukturanalysen der *C. elegans mev-1* Mutante (3.6.1), die eine erhöhte Toleranz gegenüber FP aufweist, rücken diese Mutation in der Bindungstasche des mitochondrialen Komplexes II in den Fokus. Die Mutation an Position 71 (*C. elegans*, G71E) könnte durch eine Konformationsänderung der Ubichinon-Bindungstasche dazu führen, dass die Affinität von Ubichinon zur Bindungstasche gegenüber der von FP erhöht ist (3.6.1). Dies würde auch die FP-Toleranz der *mev-1* Mutante erklären. Bisher wurde das Glycin an Position 71 noch nicht als kritischer Bindungstaschenrest beschrieben. Eine phylogenetische Analyse der konservierten Bereiche der Komplex II Sequenz mit Fokus auf die Stelle der G71E Mutation lieferte einen weiteren Hinweis darauf, dass FP auch in anderen Nematoden wirkt. Innerhalb der Nematoden und Pilze ist auf Position 71 der untersuchten Arten ein Glycin zu finden. Dies kann, gemeinsam mit der Tatsache, dass in allen anderen phylogenetisch analysierten Organismen kein Glycin zu finden ist, die spezifische Wirkung von FP auf Nematoden und Pilze erklären. Sobald Glycin durch eine andere Aminosäure ausgetauscht wird, resultiert aus einer möglichen Lage der Seitenkette in der Bindungstasche eine Inhibition der FP-Bindung. Dies wird von der Tatsache unterstützt, dass die FP-Behandlung von Organismen, die kein Glycin an der Position 71 haben

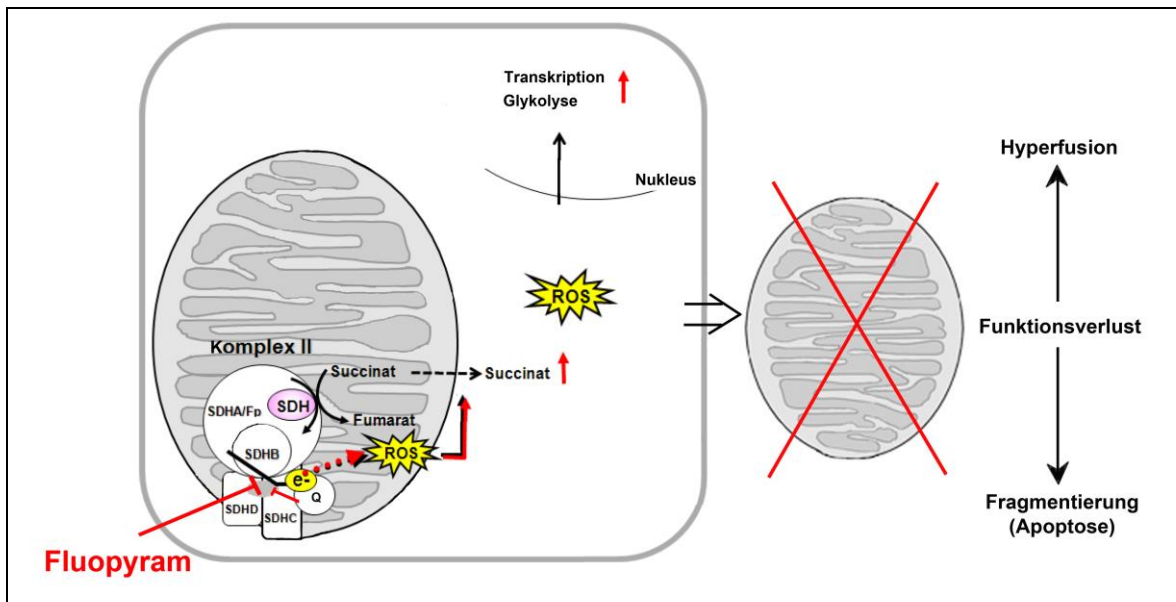
(z. B. HEK 293 Zellen (humane embryonale Leberzellen), Mäuse und Zebrafische) keine Wirkung zeigt (Burns et al. 2015).

Von Mutanten, in denen die Ubichinon Synthese gestört ist (MQ513 (*clk-1*)), ist bekannt, dass vorwiegend der alternative, anaerobe Signalweg der Re-Oxidation von NADH abläuft und dies wiederum zu einer verlängerten Lebensspanne führt (Anson und Hansford, 2004; Feng et al. 2001; Stenmark et al. 2001). Die FP-Behandlung der *C. elegans clk-1* Mutante (MQ513) führte, wie auch für den WT, zum beschriebenen Arrest der Entwicklung (3.4). Dies lässt vermuten, dass FP auch die alternative rückwärtslaufende Elektronentransportkette effektiv inhibiert.

#### 4.6.2 Modell zur Inhibition der Elektronentransportkette durch FP

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte *C. elegans mev-1* Mutante lässt als einen Wirkort von FP die Ubichinon-Bindungstasche in Komplex II der Elektronentransportkette vermuten. Die dadurch induzierte Inhibition der Succinat-Dehydrogenase führt zu einer Akkumulation von Succinat in der Mitochondrienmatrix (Rea und Johnson 2003). Der Ausfall von Komplex II führt zur verstärkten ROS-Produktion der Komplexe I und III (Dröse 2013). Das erhöhte ROS-Vorkommen wirkt sich negativ auf die Mitochondrienfunktion aus und schadet so im Folgenden dem gesamten Organismus (Abbildung 4-1). Eine erhöhte ROS-Konzentration in der Zelle führt dazu, dass Alterungsprozesse vorangetrieben werden (Schaar et al. 2015). Diese Alterungsprozesse äußern sich zunächst durch oxidative Schäden an der mitochondrialen DNA, was in einem Funktionsverlust der Mitochondrien resultiert (Quirós et al. 2016). Vor dem Funktionsverlust des Mitochondriums kann jedoch eine Änderung der Morphologie des selben beobachtet werden. Eine hier beobachtete Hyperfusion der Mitochondrien könnte der Funktionserhaltung dienen und somit eine Rettung der Energiegewinnung bewirken (Rolland et al. 2013). Die Fragmentierung der Cristae hingegen ist ein erster Hinweis auf den Abbau der Mitochondrien (Guillery et al. 2008; Liot et al. 2009) (Abbildung 4-1). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass FP den Modellorganismus *C. elegans* durch die Inhibition der Energiegewinnung in seiner Entwicklung hemmt und in hohen Konzentrationen für Embryonen und Larven letal ist.





**Abbildung 4-1 | Modell zur Inhibition von Komplex II der mitochondrialen Elektronentransportkette durch Fluopyram.**

FP inhibiert Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase (SDH), über die Ubichinon-Bindungstasche der Untereinheiten SDHB, SDHC und SDHD. Durch die Blockade der Ubichinon-Bindungstasche durch FP entweichen Elektronen (e<sup>-</sup>), da der Elektronencarrier Ubichinon (Q) nicht mehr binden kann. Dies führt zur Überproduktion von ROS, was zum einen zu einer veränderter Transkription und zum anderen zur Funktionsveränderung der Mitochondrien führt (Ishii et al. 2013). Als Reaktion auf diesen Funktionsverlust kommt es entweder zur Hyperfusion der Mitochondrien (Erhaltung der Energiegewinnung) (Rolland et al. 2013) oder zur Fragmentierung der Cristae (Mitophagie) (Luz et al. 2015; Guillery et al. 2008).

## 4.7 Fluopyram-Behandlung an *C. elegans* als Modell für parasitäre Nematoden

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *C. elegans* vergleichend als Modell für parasitäre Nematoden angewendet werden kann. Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass *C. elegans* als ideales Testsystem für nematizide Wirkstoffe herangezogen werden kann. Kontrollierte Laborbedingungen erlauben die Beobachtung unterschiedlicher Parameter.

Die Ausweitung des FP-Assays auf das Phylum der Nematoden (3.2.5) ermöglichte es, freilebende Vertreter anderer Kladen (9 – 11) auf Agarplatten bei identischen Fütterungskonditionen zu halten (Lewis et al. 2009). Dabei wurde deutlich, dass der hermaphroditische Reproduktionsmodus resistenter gegenüber einer FP-Behandlung ist (3.2.5). Die untersuchten Gattungen der *Panagrolaimus* sowie der *Acrobelloides*, die den Kladen 10 und 11 zuzuordnen sind, weisen nahe verwandte pflanzenparasitische Arten der selben Kladen auf (van Megen et al. 2009). Dies ist ein weiteres Indiz für die Anwendbarkeit der für *C. elegans* WT erhaltenen Ergebnisse auf pflanzenparasitäre Nematoden.

Man muss jedoch die Untergliederungen der Phytonematoden in zwei Gruppen von Parasiten berücksichtigen: die meist parthenogenetischen Wurzelknoten-Parasiten und die sich vorwiegend sexuell reproduzierenden Zysten-bildenden Nematoden (Lambert und Bekal, 2002). Die Wirkung von FP auf Pflanzenparasiten scheint besonders vielversprechend, da der hermaphroditische Reproduktionsmodus, der als resistenter beschrieben wurde, in den Pflanzenparasiten seltener vertreten ist.

In weiterführenden Studien sollen die kritischen Konzentrationen während der Embryogenese der untersuchten *Acrobeloides* und *Panagrolaimus* Spezies unter Anwendung des FP-Assays auf Objektträgern bestimmt werden. Dies würde gemeinsam mit den für *C. elegans* bestimmten Konzentrationen einen weiteren Hinweis auf die Anwendbarkeit der kritischen Konzentrationen auf Pflanzenparasiten liefern.

Die Konzentrationen, die in dieser Arbeit als kritisch definiert wurden, sind verglichen mit den Feldkonzentrationen deutlich höher (4.3). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die pflanzenparasitischen Vertreter und die parthenogenetischen, freilebenden Nematoden sensibler gegenüber FP sind, was eine effektive Verwendung geringerer Konzentrationen erklärt. Dies spricht für eine Wirksamkeit des Nematizids in der Anwendung auf dem Feld zu den angegebenen Herstellerangaben. Auch die bereits bekannten kritischen Konzentrationen der Pflanzenparasiten *M. incognita*, *R. similis* und *R. reniformis* liegen unterhalb der kritischen Konzentrationen von *C. elegans* (Faske und Hurd 2015).

Die mögliche Reversibilität eines FP-bedingten Arrests (3.2.4) macht eine dauerhafte Applikation von FP gegen Pflanzenparasiten auf dem Feld unbedingt notwendig. Von der Anwendung als Fungizid ist bekannt, dass FP in gespritzter Applikation gegen Pilze auf der Pflanze verbleibt und durch das Xylem im Pflanzengewebe und in den Trieben verteilt wird (Avenot und Michailides, 2010; Vitale et al. 2016; Zhang et al. 2014). FP kann in Früchten und Gemüse noch nach der Ernte nachgewiesen werden, was für einen langen, stabilen Verbleib in der Pflanze spricht und die Gefahr der Reversibilität des Effekts verringert (Abad-Fuentes et al. 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass FP die schützende Kutikula des Wurmes (3.3) und die schwer permeable Eihülle des Embryos passieren kann (3.2.1). Obwohl die Kutikula des freilebenden Nematoden *C. elegans* im Vergleich zu Parasiten in ihrer Morphologie variiert, ist die biochemische und strukturelle Zusammenset-

zung der Kutikula konserviert (Bürglin et al. 1998). Dies lässt auf eine ebenfalls FP-permeable Kutikula bei Pflanzenparasiten schließen.

In Pflanzenparasiten, besonders in Endoparasiten, kann durch die geringere Verfügbarkeit von Sauerstoff die Elektronentransportkette unter anaeroben Bedingungen zur Produktion von ATP rückwärtslaufen (beschrieben in *A. suum*). Es wurde gezeigt, dass der freilebende Nematode *C. elegans* im Vergleich zum parasitischen Nematoden *A. suum* eine vergleichbare Menge des dafür notwendigen Rhodochinons besitzt (Takamiya et al. 1999). Da die Ubichinon defiziente Mutante MQ513, bei der die Elektronentransportkette vorwiegend rückwärts läuft, keine verstärkte FP-Toleranz zeigt (3.4), kann von einer Inhibition der rückwärtslaufenden Elektronentransportkette durch FP ausgegangen werden.

Die vergleichenden Sequenzanalysen der Ubichinon-Bindungstaschen des Komplexes II innerhalb der Nematoden weist durch konservierte nematoden- und pilzspezifische Positionen von Aminosäuren darauf hin, dass FP in Nematoden und Pilzen wirkt (3.6.2). Ebenso konnten phylogenetische Untersuchungen der Punktmutation der *C. elegans mev-1* Mutante ein hochkonserviertes Glycin an der Position G71E identifizieren, das einzig in Nematoden und Pilzen vorkommt (3.6.1).

Abschließend muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Identifikation von drei FP-resistenten *dus* Allelen in einem ungesättigten Screen (3.7) auf eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Resistenzen gegen FP hinweist. Ob ein Nematizid wirkungsvoll ist, ist jedoch nicht allein durch die Generierung von Resistenzen unter Laborbedingungen zu charakterisieren. Die Anpassung von *C. elegans*, der unter kontrollierten Laborbedingungen gehalten wird, ist aufgrund des deutlich geringeren Selektionsdrucks durch fehlende Umwelteinflüsse nicht vergleichbar mit der Adaptation auf dem Feld lebender Nematoden (Holden-Dye und Walker 2014). Obwohl es viele induzierte Resistenzen gegen Nematizide wie Benzimidazole und Imidazothiazole gibt, werden die Wirkstoffe seit Jahren erfolgreich angewendet (Welz et al. 2011; Jones et al. 2005).

Molekulargenetisch sind letztendlich drei Punkte hervorzuheben, die *C. elegans* als effektives Modell für pflanzenparasitische Nematoden charakterisieren: 1) Die Analyse der Expression und Funktion von Genen, die homolog zu denen der Parasiten sind; 2) Studien der funktionellen Aspekte von parasitischen Genen in *C. elegans*; 3) Verwendung von interessanten Genen, die in *C. elegans* identifiziert wurden, als Vorlage zur Analyse in ihren parasitischen Verwandten (Bürglin et al. 1998).



## 5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Wirkungen von subletalen und letalen Dosen des gegen Pilze und pflanzenparasitische Nematoden eingesetzten Succinat-Dehydrogenase (SDH, Komplex II der Atmungskette) Inhibitors Fluopyram (FP) in Bezug auf den Lebenszyklus des freilebenden Nematoden *C. elegans*. Weiterhin sollte der Wirkungsmechanismus von FP auf zellbiologischer und molekularer Ebene charakterisiert werden.

Nach Etablierung entsprechender Assays für die FP-Behandlung (1-50 ppm) konnte gezeigt werden, dass FP die Entwicklung von *C. elegans* und die anderer freilebender Nematoden konzentrationsabhängig inhibiert. In *C. elegans* ist die kritische Konzentration bei permanenter FP-Inkubation  $\geq 5$  ppm für die Embryogenese (geringe Kutikuladefekte) und  $\geq 2$  ppm für die Entwicklung der Larve (verlangsamt) zum fertilen adulten Tier (reduzierte Nachkommenschaft). Bei höheren FP-Konzentrationen kommt es zu einer Inhibition der Embryonalentwicklung, die konzentrationsabhängig früh (vor der Gastrulation) oder später (während der Morphogenese) auftritt. Hohe FP-Konzentrationen führen außerdem zu einem Arrest der Larvalentwicklung oder dem Auftreten von sterilen, adulten Tieren mit einer veränderten Morphologie der Kutikula. In Pulsexperimenten tolerieren der *C. elegans* Embryo und die L1-Larve FP-Konzentrationen von jeweils 10 ppm für 8 min bzw. 4 Tage.

FP, das den Würmern mit den Fütterbakterien verabreicht wird, entfaltet seine Wirkung nicht ausschließlich durch die Nahrungsaufnahme. Da FP die Eihülle des *C. elegans* Embryos überwindet, penetriert es wahrscheinlich auch direkt die Kutikula von Larven und adulten Tieren. Die FP-Hypersensitivität von Kutikula-Mutanten mit einem veränderten Bewegungsmuster sowie das Auftreten entsprechender Phänotypen des Wildtyps bei permanenter FP-Behandlung unterstützen diese Hypothese.

Sowohl die *C. elegans mev-1* Mutante, die eine Punktmutation in der Ubichinon-Bindungstasche der SDH trägt (G71E in der SDHC-Untereinheit) als auch die in einem Mutagenese Screen neu isolierten Mutanten (z. B. Mutation des Komplex I der Elektronentransportkette) sind resistent gegenüber einer FP-Konzentration von 10 ppm. Die *mev-1* Mutante kann den durch die FP-Behandlung induzierten Effekt wahrscheinlich zum Teil

durch eine Hyperfusion der Mitochondrien kompensieren, wohingegen der FP-behandelte Wildtyp eine Fragmentierung der Mitochondrien aufweist.

Ein phylogenetischer Vergleich der Aminosäuresequenzen der SDHC-Untereinheit, die Teil der Ubichinon-Bindungsstelle sind, zeigte ein konserviertes Glycin (Position 71 in *C. elegans*) in Nematoden und Pilzen als potenziellen Angriffspunkt von FP. In den meisten anderen untersuchten Spezies, welche FP-insensitiv sind, befindet sich an Position 71 ein Isoleucin.

Insgesamt demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass der Nematode *C. elegans* als robustes Testsystem eingesetzt werden kann, um nematizide Wirkstoffe auf verschiedensten Ebenen zu analysieren. Ihre Wirksamkeit kann so, angefangen beim Lebenszyklus über die Organ- und Zellebene bis hin zu dem molekularen Wirkmechanismus, beschrieben werden und dient als Modell für pflanzenparasitische Nematoden.

## 6 Abstract

Fluopyram (FP) is a commercial nematicide that acts by inhibiting succinate dehydrogenase (SDH, complex II of the respiratory chain). This work characterizes the molecular mode of action of FP by monitoring the effects of sublethal and lethal FP doses on the life-cycle and cellular effects of the free-living nematode *C. elegans*.

After establishing appropriate assays for FP treatment (1-50 ppm), it was found that FP inhibits the development of *C. elegans* and other free-living nematodes in a concentration-dependent manner. In *C. elegans*, the critical concentration during permanent FP incubation is  $\geq 5$  ppm for embryogenesis (cuticular defects), and  $\geq 2$  ppm for larval development (decelerated) to the fertile adult animal (reduced progeny). At higher FP concentrations inhibition of embryonic development occurs in a concentration-dependent manner early (before gastrulation) or later (during morphogenesis) stages. High FP concentrations also lead to an arrest of the larval development or the appearance of sterile, adult animals with an altered cuticle-morphology. In pulse experiments, the *C. elegans* embryo and the L1 larva tolerate FP concentrations of 10 ppm for 8 min and 4 days, respectively. FP is administered via bacterial feeding and does not appear to exert its effect solely by food intake. As FP crosses the eggshell of the *C. elegans* embryo, it is likely to penetrate directly into the cuticle of larvae and adult animals. Support for this hypothesis comes from the observation that cuticle-mutants, which are FP-hypersensitive, as well as FP-treated WT worms, both exhibit similar aberrant locomotion.

The *C. elegans mev-1* mutant, which carries a point mutation in the ubiquinone binding pocket of SDH (G71E in the SDHC subunit), and newly isolated mutants (e. g. mutation of the complex I of the electron transport chain) in a mutagenesis screen are resistant to FP concentrations up to 10 ppm. The *mev-1* mutant can probably compensate the effect induced by FP treatment partially by hyperfusion of the mitochondria since the FP-treated wild-type shows fragmented mitochondria.

A phylogenetic comparison of the amino acid sequences of the SDHC subunit, which are part of the ubiquinone-binding site, shows a conserved glycine (position 71 in *C. elegans*) in nematodes and fungi as a probable target of FP. In most other investigated species, which are FP-insensitive, an isoleucine is found at position 71.

Overall, the results of the work presented here demonstrate that the nematode *C. elegans* can be utilized as a model for plant-parasitic nematodes at various levels. Their molecular mechanism of action and efficacy can be tested on the life-cycle, down to the level of organs and cells.



## Literaturverzeichnis

- Abad-Fuentes A, Ceballos-Alcantarilla E, Mercader J V., Agulló C, Abad-Somovilla A & Esteve-Turrillas FA (2015) Determination of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 4207–4211.
- Aguilaniu H, Durieux J & Dillin A (2005) Metabolism, ubiquinone synthesis, and longevity. *Genes Dev.* 19, 2399–2406.
- Altschul S, Gish W, Miller W, EW M & Lipman D (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403–410.
- Anderson P & Brenner S (1984) A selection for myosin heavy chain mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 4470–4.
- Anson RM & Hansford RG (2004) Mitochondrial influence on aging rate in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 3, 29–34.
- Artal-Sanz M, de Jong L & Tavernarakis N (2006) *Caenorhabditis elegans*: A versatile platform for drug discovery. *Biotechnol. J.* 1, 1405–1418.
- Auer R, Kalimo H, Olsson Y & Wieloch T (1985) The dentate gyrus in hypoglycemia: pathology implicating excitotoxin-mediated neuronal necrosis. *Acta Neuropathol.* 67, 279–88.
- Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, Jordan T, Shakir K, Roazen D, Thibault J, Banks E, Garimella K V, Altschuler D, Gabriel S & DePristo MA (2002) From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 11, 11.10.1–11.10.33.
- Avenot H & Michailides TJ (2010) Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 29, 643–651.
- Bailey DC, Todt CE, Orfield SE, Denney RD, Snapp IB, Negga R, Montgomery KM, Bailey AC, Pressley AS, Traynor WL & Fitsanakis VA (2016) *Caenorhabditis elegans* chronically exposed to a Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate fungicide show mitochondrial Complex I inhibition and increased reactive oxygen species. *Neurotoxicology* 56, 170–179.
- Baird J, Schiavon M, Mundo M & Becker JO (2016) A New Nematicide Against the Pacific Shoot-gall Nematode *Anguina pacificae*. In *Turfgrass and Landscape Research Field Day*. University of California Agriculture and Natural Resources, pp.13 (1-2).
- Benedetti C, Haynes CM, Yang Y, Harding HP & Ron D (2006) Ubiquitin-Like Protein 5 Positively Regulates Chaperone Gene Expression in the Mitochondrial Unfolded Protein Response. *Genetics* 174, 229–239.
- Bernt U, Junkersdorf B, Londershausen M, Harder A & Schierenberg E (1998) Effects of anthelmintics with different modes of action on the behavior and development of *Caenorhabditis elegans*. *Fundam. Appl. Nematol.* 21, 251–263.
- Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1513.
- Bito T, Misaki T, Yabuta Y, Ishikawa T, Kawano T & Watanabe F (2017) Vitamin B12 deficiency results in severe oxidative stress, leading to memory retention impairment in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biol.* 11, 21–29.
- Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT & Thomas WK (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392, 71–75.

- Boina DR, Lewis EE & Bloomquist JR (2008) Nematicidal activity of anion transport blockers against *Meloidogyne incognita*, *Caenorhabditis elegans* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Pest Manag. Sci.* 64, 646–653.
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.
- Broeksma A, Puetzkühl K, Lamprecht S & Fuersch H (2014) VELUM—A evolutionary nematicide for efficient crop production. In *Journal of nematology*. pp.140–141.
- Bürglin TR, Lobos E & Blaxter ML (1998) *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes. *Int. J. Parasitol.* 28, 395–411.
- Burns AR, Kwok TCY, Howard A, Houston E, Johanson K, Chan A, Cutler SR, McCourt P & Roy PJ (2006) High-throughput screening of small molecules for bioactivity and target identification in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Protoc.* 1, 1906–1914.
- Burns AR, Luciani GM, Musso G, Bagg R, Yeo M, Zhang Y, Rajendran L, Glavin J, Hunter R, Redman E, Stasiuk S, Schertzberg M, Angus McQuibban G, Caffrey CR, Cutler SR, Tyers M, Giaever G, Nislow C, Fraser AG, MacRae C a., Gilleard J & Roy PJ (2015) *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. *Nat. Commun.* 6, 7485.
- Butler J a, Mishur RJ, Bhaskaran S & Rea SL (2013) A metabolic signature for long life in the *Caenorhabditis elegans* Mit mutants. *Aging Cell* 12, 130–8.
- Campbell NA, Reece JB & Markl J (2006) *Biologie* 6. Auflage., Pearson, München.
- Castagnone-Sereno P (2006) Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity (Edinb.)*. 96, 282–9.
- Chaweeborisuit P, Suriyonplengsaeng C, Suphamungmee W, Sobhon P & Meemon K (2016) Nematicidal effect of plumbagin on *Caenorhabditis elegans*: A model for testing a nematicidal drug. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 71, 121–131.
- Chitwood DJ (2003a) Nematicides. In *Encyclopedia of Agrochemicals*. New York: Academic Press, pp.1104–1115.
- Chitwood DJ (2003b) Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. *Pest Manag. Sci.* 59, 748–753.
- Chomczynski P & Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X & Ruden DM (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w 1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 6, 80–92.
- Clark JM (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16, 9677–9686.
- Coghlan A (2005) Nematode genome evolution. In *WormBook : the online review of C. elegans biology*. pp.1–15.
- Cole TS & Schierenberg E (1986) Laser microbeam-induced fixation for electronmicroscopy: Visualization of transient developmental features in nematode embryos. *Experientia* 42, 1046–1048.
- Deppe U, Schierenberg E, Cole T, Krieg C, Schmitt D, Yoder B & von Ehrenstein G (1978) Cell lineages of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 376–80.
- DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella K V, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernysky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D & Daly MJ (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* 43, 491–8.
- Dibb NJ, Brown DM, Karn J, Moerman DG, Bolten SL & Waterston RH (1985) Sequence analysis of mutations that affect the synthesis, assembly and enzymatic activity of the unc-54 myosin heavy chain of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 183, 543–551.

- Dillman AR, Minor PJ & Sternberg PW (2013) Origin and evolution of dishevelled. *G3 Genes Genomes Genet.* 3, 251–262.
- Dröse S (2013) Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 578–87.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Edgar RS, Cox GN, Kusch M & Politz JC (1982) The Cuticle of *Caenorhabditis elegans*. *J. Nematol.* 14, 248–58.
- Faske TR & Hurd K (2015) Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to Flupyram. *J. Nematol.* 47, 216–321.
- Feng J, Bussi  re F & Hekimi S (2001) Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Cell* 1, 633–644.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE & Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Francis GR & Waterston RH (1985) Muscle organization in *Caenorhabditis elegans*: Localization of proteins implicated in thin filament attachment and I-band organization. *J. Cell Biol.* 101, 1532–1549.
- Fuller VL, Lilley CJ & Urwin PE (2008) Nematode resistance. *New Phytol.* 180, 27–44.
- Gomes LC, Benedetto G Di, Scorrano L, Di Benedetto G & Scorrano L (2011) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* 13, 589–598.
- Gomez-Amaro RL, Valentine ER, Carretero M, Leboeuf SE, Rangaraju S, Broadus CD, Solis GM, Williamson JR & Petrascheck M (2015) Measuring food intake and nutrient absorption in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 200, 443–454.
- Guillery O, Malka F, Frachon P, Milea D, Rojo M & Lomb  s A (2008) Modulation of mitochondrial morphology by bioenergetics defects in primary human fibroblasts. *Neuromuscul. Disord.* 18, 319–330.
- Hamilton B, Dong Y, Shindo M, Liu W, Odell I, Ruvkun G & Lee SS (2005) A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans*. *Genes Dev.* 19, 1544–1555.
- Hench J, Brati  c Hench I, Pujol C, Ipsen S, Brodesser S, Mourier A, Tolnay M, Frank S & Trifunovi   A (2011) A Tissue-Specific Approach to the Analysis of Metabolic Changes in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 6, e28417.
- Hoffmann M, Bellance N, Rossignol R, Koopman WJH, Willems PHGM, Mayatepek E, Bossinger O & Distelmaier F (2009) *C. elegans* ATAD-3 is essential for mitochondrial activity and development. *PLoS One* 4, e7644.
- Hoffmann M, Honnen S, Mayatepek E, W  tjen W, Koopman WJH, Bossinger O & Distelmaier F (2012) MICS-1 interacts with mitochondrial ATAD-3 and modulates lifespan in *C. elegans*. *Exp. Gerontol.* 47, 270–5.
- Holden-Dye L & Walker RJ (2014) Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. In *WormBook, ed. The C. elegans Research Community*. pp.1–29.
- Holterman M, Van Der Wurff A, Van Den Elsen S, Van Megen H, Bongers T, Holovachov O, Bakker J & Helder J (2006) Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1792–1800.
- Huelsenbeck JP & Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Inaoka DK, Shiba T, Sato D, Balogun EO, Sasaki T, Nagahama M, Oda M, Matsuoka S, Ohmori J, Honma T, Inoue M, Kita K & Harada S (2015) Structural insights into the molecular design of flutolanil derivatives targeted for fumarate respiration of parasite mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 15287–15308.
- Inoue H, Nojima H & Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28.

- Ishii H, Miyamoto T, Ushio S & Kakishima M (2011) Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii*. *Pest Manag. Sci.* 67, 474–482.
- Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D & Suzuki K (1998) A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 394, 694–697.
- Ishii N, Takahashi K, Tomita S, Keino T, Honda S, Yoshino K & Suzuki K (1990) A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutat. Res.* 237, 165–71.
- Ishii T, Miyazawa M, Hartman PS & Ishii N (2011) Mitochondrial superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) inducible ‘mev-1’ animal models for aging research. *BMB Rep.* 44, 298–305.
- Ishii T, Miyazawa M & Onouchi H (2013) Model animals for the study of oxidative stress from complex II. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 588–597.
- Ito Y, Muraguchi H, Seshime Y, Oita S & Yanagi SO (2004) Flutolanil and carboxin resistance in *Coprinus cinereus* conferred by a mutation in the cytochrome b560 subunit of succinate dehydrogenase complex (Complex II). *Mol. Genet. genomics* 272, 328–35.
- Iverson TM (2013) Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1827, 648–657.
- Jagasia R, Grote P, Westermann B & Conradt B (2005) DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature* 433, 754–760.
- Jobson MA, Jordan JM, Sandrof MA, Hibshman JD, Lennox AL & Baugh LR (2015) Transgenerational effects of early life starvation on growth, reproduction, and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 201, 201–212.
- Jones AK, Buckingham SD & Sattelle DB (2005) Chemistry-to-gene screens in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 321–330.
- Jones MR, Rose AM & Baillie DL (2013) The ortholog of the human proto-oncogene ROS1 is required for epithelial development in *C. elegans*. *Genesis* 51, 545–561.
- Jorgensen EM & Mango SE (2002) The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Rev. Genet.* 3, 356–69.
- Kaletta T & Hengartner MO (2006) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 387–98.
- Kamath RS & Ahringer J (2003) Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 30, 313–321.
- Kaminsky R, Ducray P, Jung M, Clover R, Rufener L, Bouvier J, Weber SS, Wenger A, Wieland-berghausen S, Goebel T, Gauvry N, Pautrat F, Skripsky T, Froelich O, Komoin-Oka C, Westlund B, Sluder A, Mäser P & Ma P (2008) A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature* 452, 176–180.
- Kiontke KC, Félix M-A, Ailion M, Rockman M V, Braendle C, Pénigault J-B & Fitch DH (2011) A phylogeny and molecular barcodes for *Caenorhabditis*, with numerous new species from rotting fruits. *BMC Evol. Biol.* 11, 339.
- Lahl V, Halama C & Schierenberg E (2003) Comparative and experimental embryogenesis of Plectidae (Nematoda). *Dev. Genes Evol.* 213, 18–27.
- Lakowski B & Hekimi S (1998) The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13091–6.
- Lambert K & Bekal S (2002) Introduction to Plant-Parasitic Nematodes. In *The Plant Health Instructor*. pp.12.
- Lee RY, Sawin ER, Chalfie M, Horvitz HR & Avery L (1999) EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* 19, 159–167.

- Levy a D, Yang J & Kramer JM (1993) Molecular and genetic analyses of the *Caenorhabditis elegans* dpy-2 and dpy-10 collagen genes: a variety of molecular alterations affect organismal morphology. *Mol. Biol. Cell* 4, 803–17.
- Lewis SC, Dyal L a, Hilburn CF, Weitz S, Liao W-S, Lamunyon CW & Denver DR (2009) Molecular evolution in *Panagrolaimus* nematodes: origins of parthenogenesis, hermaphroditism and the Antarctic species *P. davidi*. *BMC Evol. Biol.* 9, 15.
- Li H & Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760.
- Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N & Bossy-Wetzel E (2009) Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ.* 16, 899–909.
- Lu Y, Rolland SG & Conradt B (2011) A molecular switch that governs mitochondrial fusion and fission mediated by the BCL2-like protein CED-9 of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E813–E822.
- Lunt DH (2008) Genetic tests of ancient asexuality in Root Knot Nematodes reveal recent hybrid origins. *BMC Evol. Biol.* 8, 194.
- Luz AL, Rooney JP, Kubik LL, Gonzalez CP, Song DH & Meyer JN (2015) Mitochondrial morphology and fundamental parameters of the mitochondrial respiratory chain are altered in *Caenorhabditis elegans* strains deficient in mitochondrial dynamics and homeostasis processes G. López Lluch, ed. *PLoS One* 10, e0130940.
- Mathews EA, Mullen GP, Crowell JA, Duerr JS, McManus JR, Duke A, Gaskin J & Rand JB (2007) Differential expression and function of synaptotagmin 1 isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 642–652.
- McClure MA & Schmitt ME (2012) A Method for Screening Candidate Nematicides against the pacific shoot-gall Nematode, *Anguina pacificae*. *Nematropica* 42, 146–152.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M & DePristo MA (2010) The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20, 1297–1303.
- van Megen H, van den Elsen S, Holterman M, Karssen G, Mooyman P, Bongers T, Holovachov O, Bakker J & Helder J (2009) A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology* 11, 927–950.
- Meldal BHM, Debenham NJ, De Ley P, De Ley IT, Vanfleteren JR, Vierstraete AR, Bert W, Borgonie G, Moens T, Tyler PA, Austen MC, Blaxter ML, Rogers AD & Lamshead PJD (2007) An improved molecular phylogeny of the Nematoda with special emphasis on marine taxa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 42, 622–636.
- Melzak KA, Sherwood CS, Turner RFB & Haynes CA (1996) Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 181, 635–644.
- Minevich G, Zhang F & Carrera I (2014) An update on mutant identification by combined SNP mapping/whole genome sequencing and CloudMap data analysis. *Worm Breeder's Gaz. Vol. 20* 20, 5–6.
- Mittwoch U (1978) Parthenogenesis. *J. Med. Genet.* 15, 165–181.
- Moriwaki T, Kato Y, Nakamura C, Ishikawa S & Zhang-Akiyama Q-M (2015) A novel DNA damage response mediated by DNA mismatch repair in *Caenorhabditis elegans*: induction of programmed autophagic cell death in non-dividing cells. *Genes Cancer* 6, 341–55.
- Müller WA & Hassel M (2006) *Entwicklungsbiologie* 4. Auflage., Berlin, Heidelberg.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263–73.
- Nomarski G (1955) Differential microinterferometer with polarized waves. *J. Phys. Radium* 16, 95–115.

- Oka T & Futai M (2000) Requirement of V-ATPase for ovulation and embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 275, 29556–29561.
- Olson SK, Greenan G, Desai A, Müller-Reichert T & Oegema K (2012) Hierarchical assembly of the eggshell and permeability barrier in *C. elegans*. *J. Cell Biol.* 198, 731–748.
- Osanai A, Harada S, Sakamoto K, Shimizu H, Inaoka DK & Kita K (2009) Crystallization of mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* with the specific inhibitor flutolanil. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 65, 941–944.
- Page AP & Johnstone IL (2007) The cuticle. In *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community. pp.1–15.
- Page AP, Stepek G, Winter AD & Pertab D (2014) Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target? *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4, 133–141.
- Peixoto C, Alves L, de Melo J & de Souza W (2000) Ultrastructural analyses of the *Caenorhabditis elegans* sqt-1(sc13) left roller mutant. *J. Parasitol.* 86, 269–274.
- Piliipiuk J, Lefebvre C, Wiesenfahrt T, Legouis R & Bossinger O (2009) Increased IP3/Ca2+ signaling compensates depletion of LET-413/DLG-1 in *C. elegans* epithelial junction assembly. *Dev. Biol.* 327, 34–47.
- Put K, Bollens T, Wäckers F & Pekas A (2016) Non-target effects of commonly used plant protection products in roses on the predatory mite *Euseius gallicus* Kreiter & Tixier (Acari: Phytoseidae). *Pest Manag. Sci.* 72, 1373.
- Quail MA, Kozarewa I, Smith F, Scally A, Stephens PJ, Durbin RM, Swerdlow H & Turner DJ (2009) A large genome centre's improvements to the Illumina sequencing system. *Nat. Methods* 5, 1005–1010.
- Quirós PM, Mottis A & Auwerx J (2016) Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 213–226.
- Rea S & Johnson TE (2003) A metabolic model for life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Cell* 5, 197–203.
- Richardson KC, Jarett L & Finke EH (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.* 35, 313–323.
- Riddle IDL, Blumenthal T, Meyer BJ & Eds JRP (1997) *C. elegans II*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Robinson JT & Thorvaldsdóttir H (2011) Integrative Genomics Viewer. *Nat. Biotechnol.* 29, 24–26.
- Rolland SG, Motori E, Memar N, Hench J, Frank S, Winkhofer KF & Conradt B (2013) Impaired complex IV activity in response to loss of LRPPRC function can be compensated by mitochondrial hyperfusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E2967–76.
- Rourke EJO, Soukas AA, Carr CE, O'Rourke EJ, Soukas AA, Carr CE & Ruvkun G (2009) *C. elegans* Major Fats Are Stored in Vesicles Distinct from Lysosome-Related Organelles. *Cell Metab.* 10, 430–435.
- Rustin P, Munnich A & Rötig A (2002) Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *Eur. J. Hum. Genet.* 10, 289–291.
- Ruvkun G & Finney M (2000) Antibody Staining of Formaldehyde-fixed Worms by Gary Ruvkun and Michael Finney and Modified Finney- Ruvkun protocol. 2, 2–6.
- Sakai C, Tomitsuka E, Esumi H, Harada S & Kita K (2012) Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: From parasites to cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1820, 643–651.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson R (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–7.
- Sant'anna V, Vommaro RC & de Souza W (2013) *Caenorhabditis elegans* as a model for the screening of anthelmintic compounds: Ultrastructural study of the effects of albendazole. *Exp. Parasitol.* 135, 1–8.
- Schaar CE, Dues DJ, Spielbauer KK, Machiela E, Cooper JF, Senchuk M, Hekimi S & Van Raamsdonk JM (2015) Mitochondrial and Cytoplasmic ROS Have Opposing Effects on Lifespan. *PLoS Genet.* 11, 1–24.

- Schierenberg E (1987) Reversal of cellular polarity and early cell-cell interaction in the embryo of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 122, 452–463.
- Schierenberg E & Cassada R (1986) Der Nematode *Caenorhabditis elegans* ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus. *Biol. unserer Zeit* 16, 1–7.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-YJ-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A & Liceiri K (2012) Fiji: an open source platform for biological image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Schnabel R, Hutter H, Moerman D & Schnabel H (1997) Assessing Normal Embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* Using a 4D Microscope: Variability of Development and Regional Specification. *Dev. Biol.* 184, 234–265.
- Schnabel R & Priess JR (1997) Specification of cell fates in the early embryo. In et al. Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, ed. *C. elegans II*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.361–382.
- Shimizu H, Osanai A, Sakamoto K, Inaoka DK, Shiba T, Harada S & Kita K (2012) Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum*. *J. Biochem.* 151, 589–592.
- Sierotzki H & Scalliet G (2013) A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* 103, 880–887.
- Siwik D a, Pagano PJ & Colucci WS (2001) Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2118, 53–60.
- Stamatakis A, Ludwig T & Meier H (2005) RAxML-III: A fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics* 21, 456–463.
- Stein KK & Golden A (2015) The *Caenorhabditis elegans* eggshell. In *WormBook*, ed. *The C. elegans Research Community, WormBook*. pp.1–35.
- Stenmark P, Grünler J, Mattsson J, Sindelar PJ, Nordlund P & Berthold DA (2001) A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 276, 33297–33300.
- Strauss M, Hofhaus G, Schröder RR & Kühlbrandt W (2008) Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* 27, 1154–60.
- Sulston JE & Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56, 110–56.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG & Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 119, 64–119.
- Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, Bartlam M & Rao Z (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121, 1043–1057.
- Takamiya S, Matsui T, Taka H, Murayama K, Matsuda M & Aoki T (1999) Free-living nematodes *Caenorhabditis elegans* possess in their mitochondria an additional rhodoquinone, an essential component of the eukaryotic fumarate reductase system. *Arch. Biochem. Biophys.* 371, 284–9.
- The C. elegans Sequencing Consortium (1998) Genome Sequence of the Nematode *Caenorhabditis elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science (80-. )*. 282, 2012–2018.
- Timmons L, Court DL & Fire A (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263, 103–112.
- Tinwell H, Rouquié D, Schorsch F, Geter D, Wason S & Bars R (2014) Liver tumor formation in female rat induced by fluopyram is mediated by CAR/PXR nuclear receptor activation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 70, 648–658.
- Tsang WY & Lemire BD (2003) The role of mitochondria in the life of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1638, 91–105.

- Tsang WY, Sayles LC, Grad LI, Pilgrim DB & Lemire BD (2001) Mitochondrial respiratory chain deficiency in *Caenorhabditis elegans* results in developmental arrest and increased life span. *J. Biol. Chem.* 276, 32240–6.
- Veloukas T & Karaoglanidis GS (2012) Biological activity of the succinate dehydrogenase inhibitor fluopyram against *Botrytis cinerea* and fungal baseline sensitivity. *Pest Manag. Sci.* 68, 858–864.
- Vendelbo MH & Nair KS (2011) Mitochondrial longevity pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 634–44.
- Vitale A, Panebianco A & Polizzi G (2016) Baseline sensitivity and efficacy of fluopyram against *Botrytis cinerea* from table grape in Italy. *Ann. Appl. Biol.* 169, 36–45.
- Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15, 2922–33.
- Welz C, Krüger N, Schniederjans M, Miltsch SM, Krücken J, Guest M, Holden-Dye L, Harder A & von Samson-Himmelstjerna G (2011) SLO-1-channels of parasitic nematodes reconstitute locomotor behaviour and emodepside sensitivity in *Caenorhabditis elegans* slo-1 loss of function mutants. *PLoS Pathog.* 7, e1001330.
- Wood WB (1988) The Nematode *Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Yang W & Hekimi S (2010) A Mitochondrial Superoxide Signal Triggers Increased Longevity in *Caenorhabditis elegans* H. A. Tissenbaum, ed. *PLoS Biol.* 8, e1000556.
- Yen K, Le TT, Bansal A, Narasimhan SD, Cheng JX & Tissenbaum HA (2010) A comparative study of fat storage quantitation in nematode *Caenorhabditis elegans* using label and label-free methods. *PLoS One* 5, 1–10.
- Zhang Y, Xu J, Dong F, Liu X, Wu X & Zheng Y (2014) Response of microbial community to a new fungicide fluopyram in the silty-loam agricultural soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 273–80.
- Zheng S-Q, Ding A-J, Li G-P, Wu G-S & Luo H-R (2013) Drug Absorption Efficiency in *Caenorhabditis elegans* Delivered by Different Methods C. Wicker-Thomas, ed. *PLoS One* 8, e56877.



## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
::	Promoter
°C	Grad Celsius
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
BJ	Stammkürzel des Leube-Labors
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFP	Cyan fluorescent protein=blau fluoreszierendes Protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
Dsred	Rot fluoreszierendes Protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylennitrilo)-tetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FP	Fluopyram
g	Gramm
GFP	Green fluorescent protein=grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
dH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
M	mol/Liter (molar)
MeOH	Methanol
mg	Milligramm

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OLB	Stammkürzel des Bossinger-Labors
P	Parentalgeneration
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline mit Tween
PCR	Polymerase chain reaction
pH	potentia Hydrogenii
pmol	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-vermittelte-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive oxygen spezies=Reaktive Sauerstoffspezien
rpm	Rounds per minute=Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SDS	Natriumlaurylsulfat
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
SSC	Standard Saline Citrate
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetate-EDTA
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp (N2 Varietät Bristol)
YFP	Yellow fluorescent protein=gelb fluoreszierendes Protein
x g	relative Zentrifugalkraft als vielfaches der Erdbeschleunigung (g)
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

## IUPAC-Code für Nukleotide:

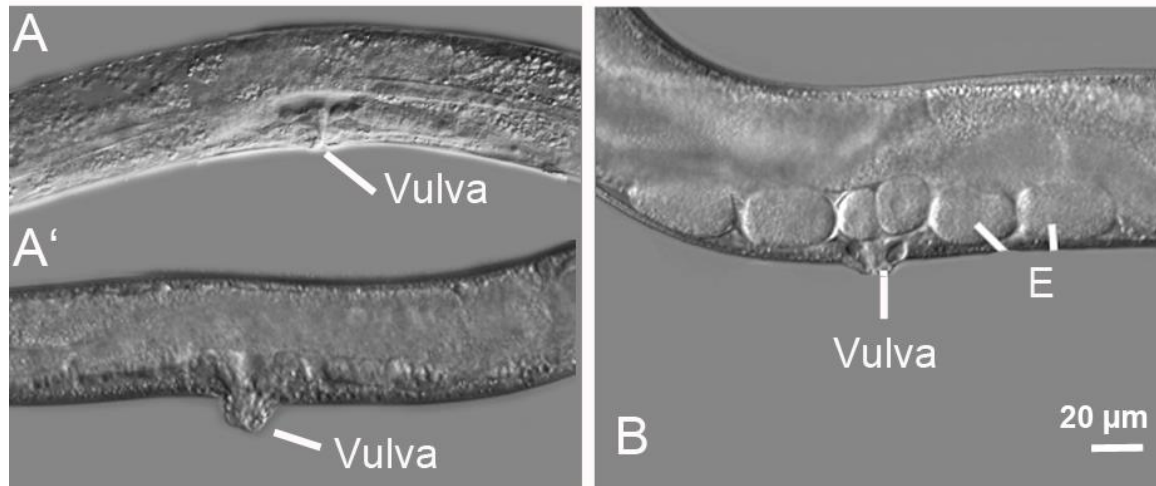
A	Adenin
B	C, G oder T
C	Cytosin
D	A, G oder T
H	A, C oder T
G	Guanin
K	G oder T
M	A oder C
N	G, A, T oder C
R	A oder G
S	C oder G
T	Thymin
V	A, C oder G
W	A oder T
Y	C oder T
U	Uracil

## IUPAC-Code für Aminosäuren:

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan

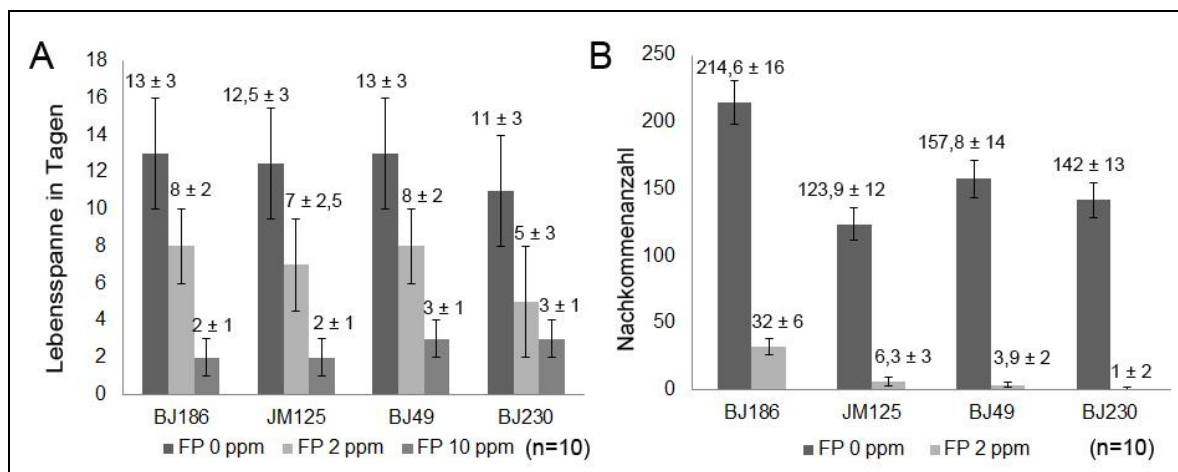


## Anhang



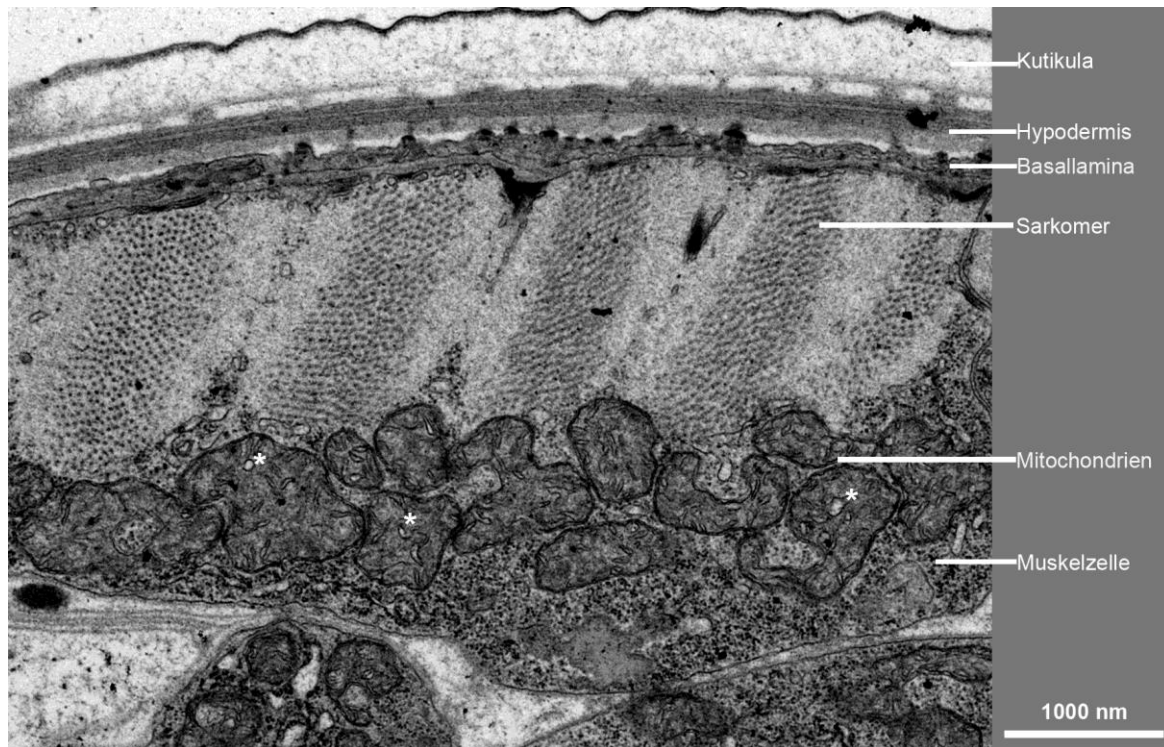
**Abbildung A-1 | Entwicklungsdefekte der Vulva unter permanenter Fluopyram-Behandlung.**

**(A)** Eine Larve, die durch FP-Behandlung (2-8 ppm) in ihrer Entwicklung arretiert ist, zeichnet sich durch eine fehlerhafte Vulvaentwicklung aus. Bei Würmern, die seit der Embryogenese mit FP-Konzentrationen von 2-10 ppm behandelt wurden, tritt der Phänotyp einer hervorstehenden Vulva gehäuft auf (**A'**). In der unbehandelten Kontrolle ist die Vulva als Organ zu erkennen, welches die Öffnung für den daran anschließenden Uterus zur Eiablage bildet (**B**). DIK-Optik, Eichstrich 20 µm.



**Abbildung A-2 | Lebensspanne und Nachkommenzahl verschiedener *C. elegans* Reporterstämme bei permanenter Fluopyram-Behandlung auf Agarplatten.**

Die folgenden Reporterstämme wurden verwendet: BJ186 (*ifo-1::yfp; myo-3::mCherry*), JM125 (*act-5::yfp*), BJ49 (*ifb-2::cfp*) und BJ230 (*pept-1::dsred; ifb-2::cfp*). **A)** Dargestellt ist die gemittelte Lebensspanne von jeweils 10 Tieren ( $\pm$  Standardabweichung) bei FP-Konzentrationen von 0–10 ppm auf Agarplatte. Der *C. elegans* WT lebt unter Laborbedingungen 25 Tage, die FP-Behandlung wirkt sich auf diesen bei 2 ppm auf eine Verkürzung der Lebensspanne auf 23 Tage und bei 10 ppm auf 18 Tage aus (3.2.1). **B)** Der Mittelwert der Nachkommen ( $\pm$  Standardabweichung) von jeweils 10 adulten Tieren bei permanenter Haltung auf FP-Agarplatten (0–2 ppm) ist hier dargestellt. Der *C. elegans* WT hat unter der Behandlung mit FP 2 ppm eine von 205 auf 65 reduzierte Nachkommenzahl (3.2.3).



**Abbildung A-3 | Elektronenmikroskopische Übersichtsdarstellung einer Muskelzelle eines adulten *C. elegans* WT nach Fluopyram-Behandlung mit 8 ppm.**

Dargestellt ist ein Querschnitt durch die Schichten der Kutikula und der darunterliegenden Hypodermis mit einem anschließenden Muskelquadranten. Der Anschnitt ermöglicht die Darstellung eines Sarkomers mit dicken und dünnen Myofilamenten sowie der begrenzenden „dense bodies“. Durch die permanente Inkubation mit FP 8 ppm zeigten Würmer vorrangig Mitochondrien mit einem abnormalen Cristae-Phänotyp (\* in weiß). Elektronenmikroskopische Aufnahmen, Eichstrich 1.000 nm.

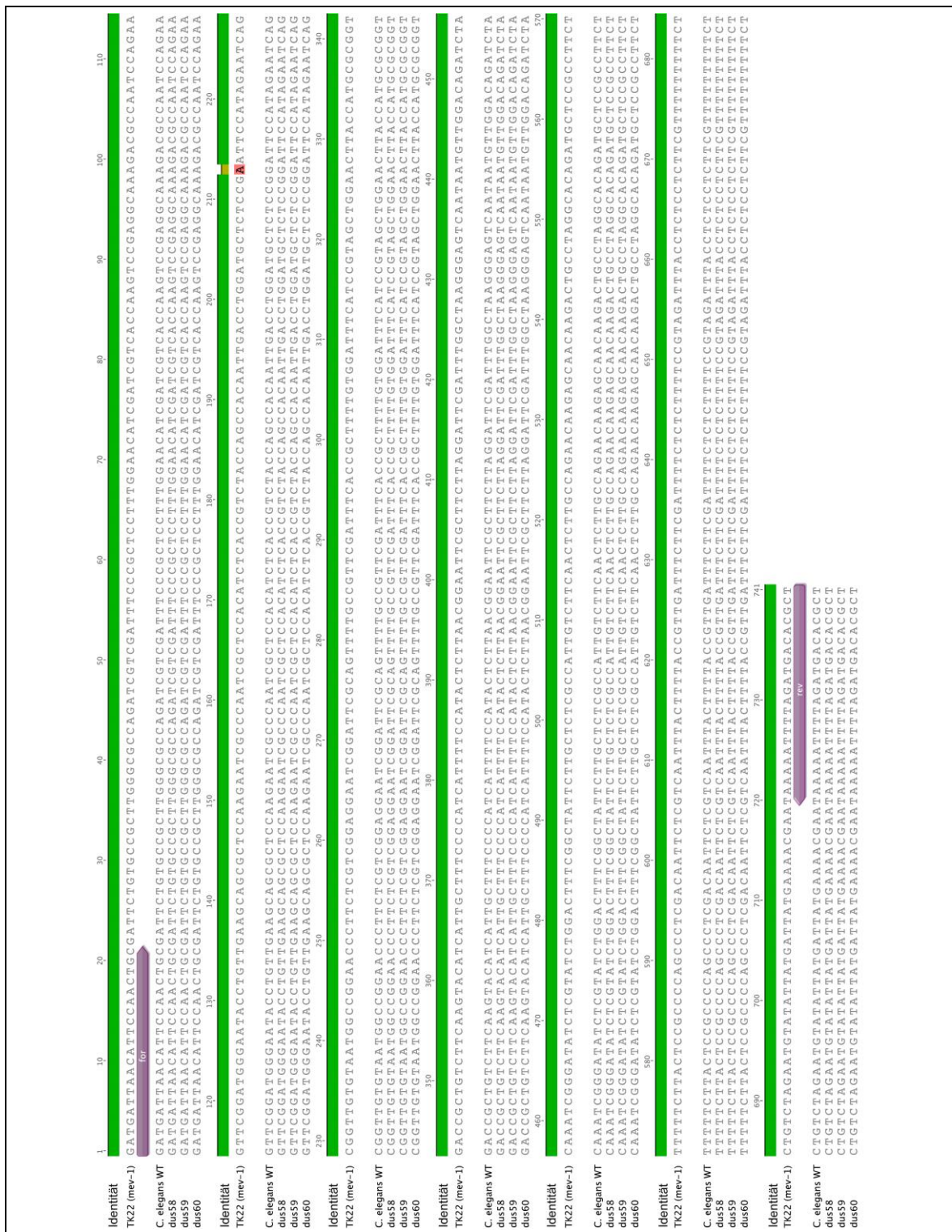
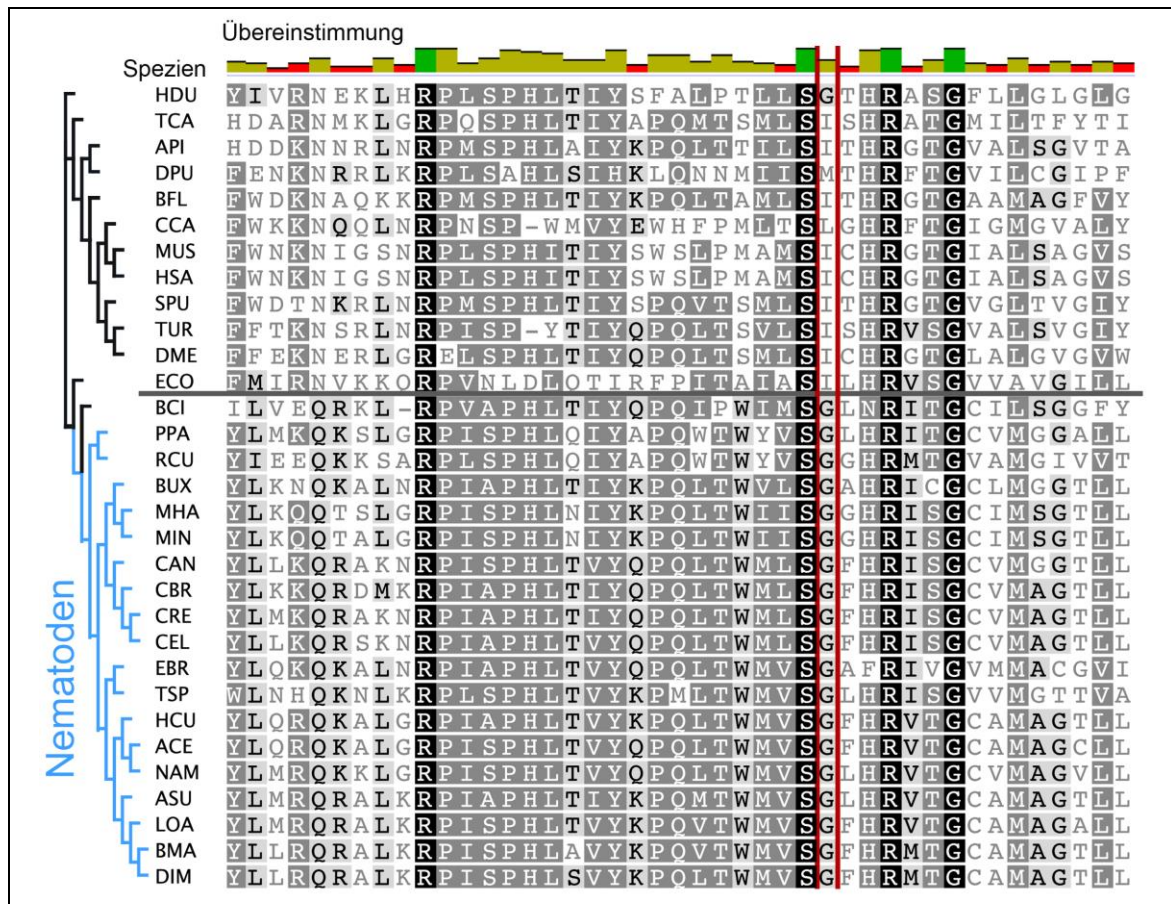


Abbildung A-4 | Nukleotid-Alignment der *sdhc-1* Sequenzen der *C. elegans mev-1* Mutante im Vergleich zum *C. elegans* WT und den neu isolierten *dus* Allelen.

Darstellung eines Nukleotid-Alignments von amplifizierten, klonierten und anschließend sequenzierten cDNA Fragmenten des *sdhc-1* Gens der *C. elegans mev-1* (TK22), des WT und der neu isolierten Allele (*dus58*, *dus59*, *dus60*). Die *C. elegans mev-1* Mutation ist durch ein A (Adenin, rot) lokalisiert. Die zu vergleichenden *sdhc-1* Sequenzen des WT und der neu isolierten Mutanten (*dus58*, *dus59*, *dus60*) beherbergen an dieser Position ein G (Guanin).

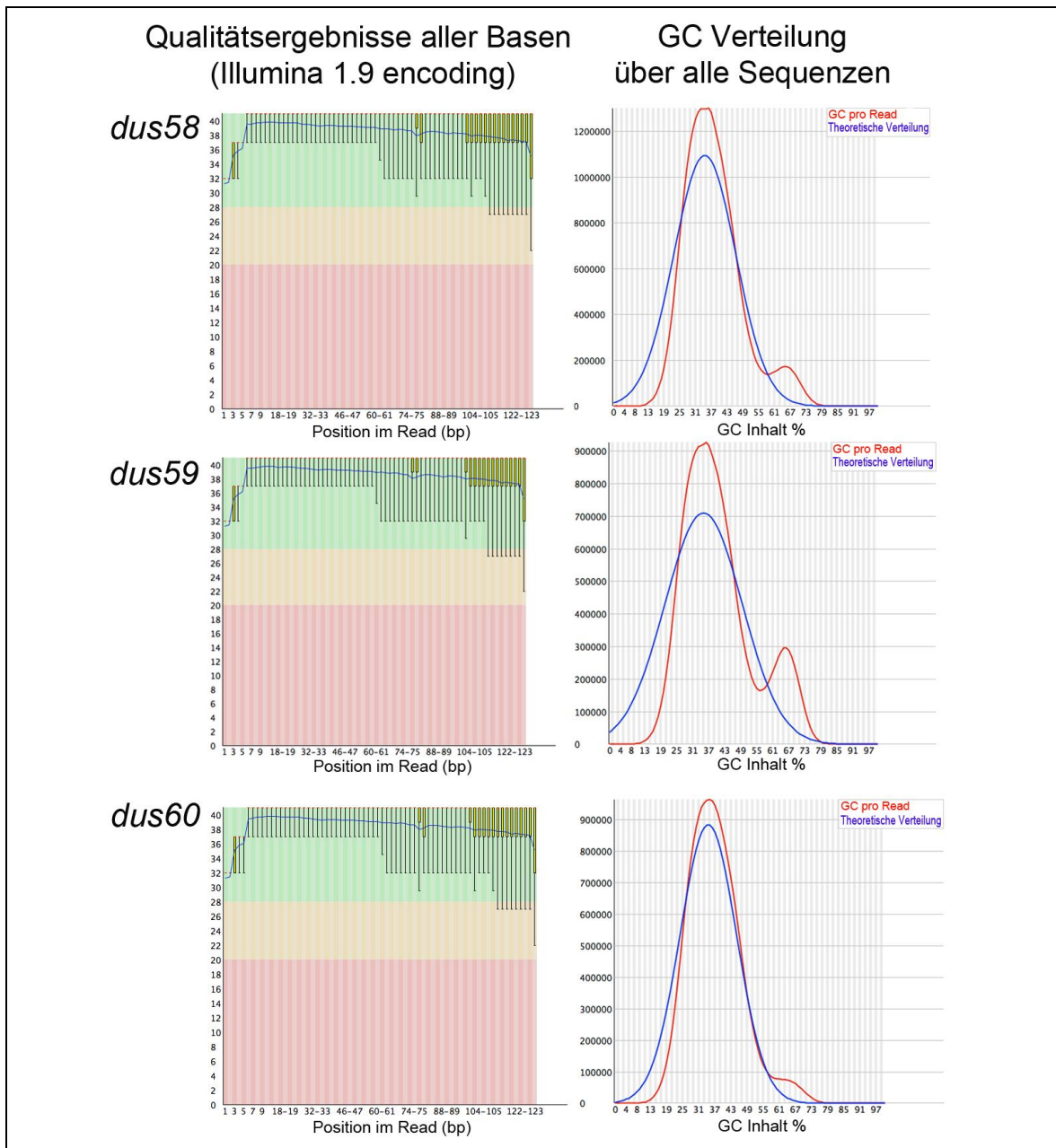




**Abbildung A-5 | Aminosäuren-Alignment der SDHC-Sequenz im hochkonservierten Bereich der Ubichinon-Bindungstasche von Nematoden und Nicht-Nematoden.**

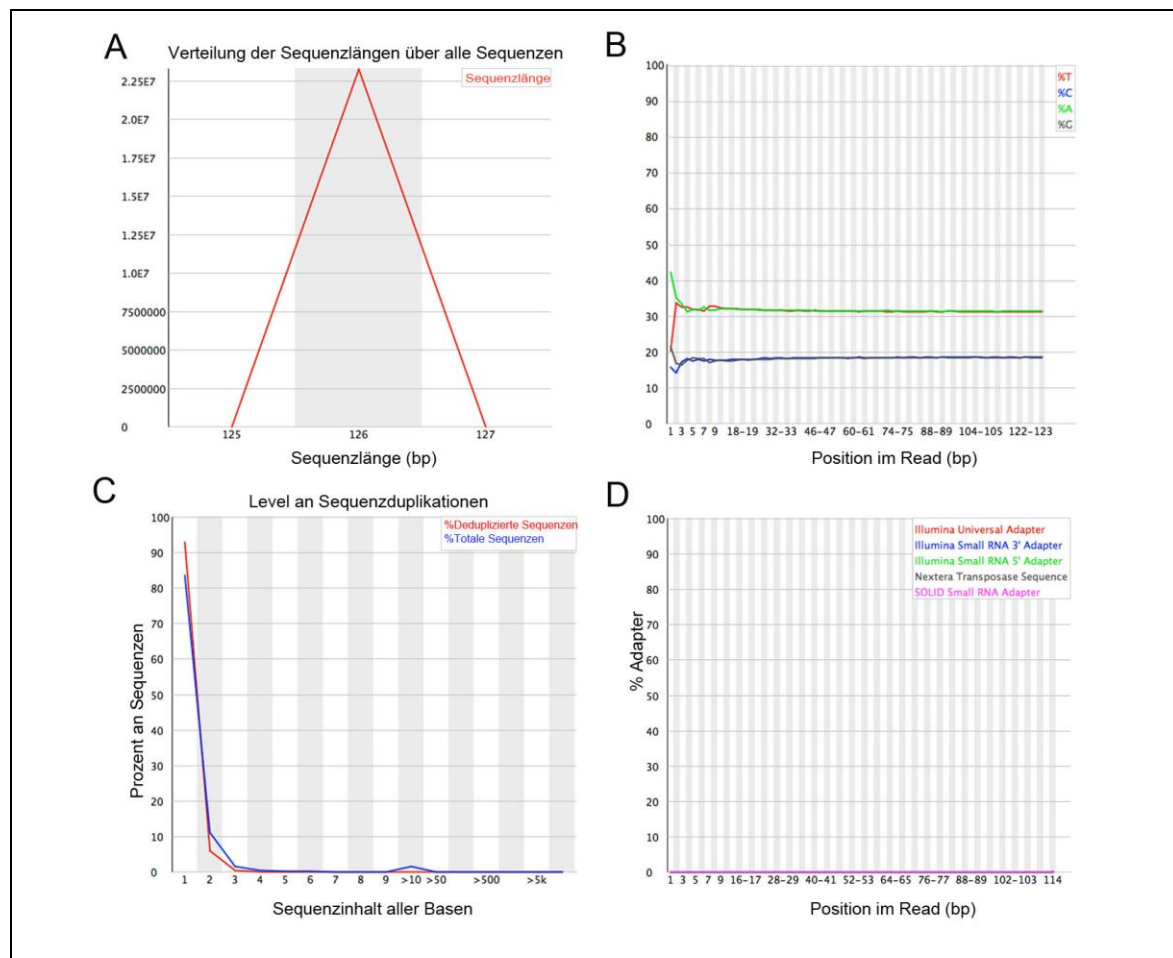
Die Darstellung eines Aminosäuren-Alignments nebst phylogenetischer Zuordnung markiert die Position der *C. elegans* *mev-1* Mutation (rote Markierung), die im WT eine kritische Position innerhalb der Ubichinon-Bindungstasche darstellt. Die Abgrenzung der Nematoden von den anderen zu vergleichenden Organismen (Vertebrata, Tardigrada, Arthropoda, Echinodermata, Chordata und Bacteria) ist durch eine horizontale Linie gekennzeichnet. In den hier dargestellten Nematodenspezies ist an dieser Position ein G (Glycin). Hingegen sind den Vertretern der Nicht-Nematoden ein I (Isoleucin), M (Methionin) oder L (Leucin) lokalisiert. Folgende Organismen wurden für das Alignment herangezogen: HDU (*H. dujardini*), TCA (*T. castaneum*), API (*A. pisum*), DPU (*D. pulex*), BFL (*B. floridae*), CCA (*C. caviae*), MUS (*M. musculus*), HSA (*H. sapiens*), SPU (*S. purpuratus*), TUR (*T. urticae*), DME (*D. melanogaster*), ECO (*E. coli*), BCI (*B. cinerea*), PPA (*P. pacificus*), RCU (*R. culicivora*), BUX (*B. xylophilus*), MHA (*M. hapla*), MIN (*M. incognita*), CAN (*C. angaria*), CBR (*C. briggsae*), CRE (*C. remanei*), CEL (*C. elegans*), EBR (*E. brevis*), TSP (*T. spiralis*), HCU (*H. contortus*), ACE (*A. ceylanicum*), NAM (*N. americanus*), ASU (*A. suum*), LOA (*L. loa*), BMA (*B. malayi*), DIM (*D. immitis*). Daten zur Verfügung gestellt von Dr. P. H. Schiffer (University College London).





**Abbildung A-6 | Qualitätsauswertung der Genomsequenzierung der neu isolierten Mutanten (*dus58*, *dus59*, *dus60*).**

Dargestellt ist die Qualität (links) der einzelnen Reads entlang ihrer 125 bp. Da sich sowohl die Anfänge der einzelnen Reads als auch die Enden im grünen, hoch qualitativen Bereich befinden, sind die ausgelesenen Reads als gut zu bewerten und benötigten keine weitere Qualitätstrimmung. Im rechten Abschnitt ist die Verteilung der Basen G und C über alle Sequenzen in den Genomen aufgetragen. Bei *C. elegans* ist von einer durchschnittlichen 37%igen Verteilung des GC Gehalts auszugehen (Riddle et al. 1997). Analyse der Sequenzdaten erstellt mit FastQC (2.3.1).



**Abbildung A-7 | Auslese der Merkmale der sequenzierten genomischen DNA der neu isolierten Mutanten (*dus58*, *dus59*, *dus60*).**

**A)** Die Verteilung der Sequenzlängen aller Reads umfasst einen durchschnittlichen Wert von 125 bp. **B)** Die Verteilung der Basenpaarungen A, T, G und C. Es sind doppelt so viele A- und T-Paarungen wie G- und C- in den Reads vorhanden. **C)** Der Sequenzinhalt zur Analyse der Verdopplung von Sequenzen ist nur für Sequenzinhalte von 1-2 bp nachzuweisen. **D)** Es ist kein Vorhandensein von Adaptern in den einzelnen Reads zu verzeichnen, was eine Trimmung von Adaptern nicht notwendig machte. Analyse der Sequenzdaten erstellt mit FastQC (2.3.1).

Tabelle A-1 | Identifizierte Polymorphismen in den neu isolierten *dus* Allelen.

Genom	Chromosom	Position im Genom	Sequenz	Gen	Wormbase ID	Beschreibung	Mutation
<b><i>dus58</i></b>	I	3371769.. 3373834	W05F2.5	<i>fbxa-203</i>	WBGene00021036	Intron	Insertion
	II	5606542.. 5607856	C17G10.7		WBGene00015919	Protein kodierend	Modifier
	II	3873541.. 3877227	C49D10.10	<i>nep-3</i>	WBGene00016778	Protein kodierend	Missense
	III	2874818.. 2880705	F56F11.3	<i>klf-1</i>	WBGene00018990	-	Insertion
	IV	16493428.. 16494510	Y51H4A.2		WBGene00013099	-	Insertion
	IV	3311276.. 3313180	W08E12.1	<i>zip-11</i>	WBGene00021082	Protein kodierend	Modifier
	IV	9096842.. 9099364	C01F6.1	<i>cpna-3</i>	WBGene00007221	Protein kodierend	Missense (Stop)
	V	18958240.. 18960172	Y39B6A.46	<i>ztf-20</i>	WBGene00012702	Protein kodierend	Modifier
	V	19777247.. 19778708	M162.11	<i>fbxa-194</i>	WBGene00044655	Protein kodierend	Modifier
	V	8705437.. 8709880	ZC178.2	-	WBGene00022536	Protein kodierend	Missense
	X	5478221.. 5478348	C25FG.17	-	-	ncRNA	Insertion
	X	3100166.. 3102279	F52E4.8	<i>ztf-13</i>	WBGene00018704	Protein kodierend	Modifier
	X	14496085.. 14499434	M163.2	<i>ztf-14</i>	WBGene00010936	Protein kodierend	Modifier
<b><i>dus59</i></b>	I	6836375.. 6838140	K02F2.2	<i>ahcy-1</i>	WBGene00019322	Intron	Insertion
	I	2802822.. 2815786	W03D8.6	<i>itx-1</i>	WBGene00002174	-	Insertion
	I	2721879.. 2726724	Y71F9B.6	-	WBGene00022128	Protein kodierend	Missense
	I	12269255.. 12272190	F41D3.10	<i>oac-25</i>	WBGene00009615	Protein kodierend	Missense
	II	3833250.. 3836015	C17A2.5	<i>oac-4</i>	WBGene00015873	-	Insertion
	II	9847483.. 9849597	ZK938.5	<i>old-2</i>	WBGene00003863	Protein kodierend	Missense
	III	62888.. 66261	W05G11.6	<i>pck-1</i>	WBGene00021043	Intron	Insertion
	III	1359254.. 1359769	Y82E9BR.9	-	WBGene00022342	Protein kodierend	Missense
	IV	12789041.. 12790512	F07C6.3	-	WBGene00008554	Protein kodierend	Missense (Stop)
	IV	13095762.. 13097065	C39E9.13	<i>rfc-3</i>	WBGene00004339	Protein kodierend	Missense
	V	14324823.. 14325539	F47B8.18	-	WBGene00219324	-	Insertion
	X	9078241.. 9078332	F47E1.13	-	WBGene00199722	ncRNA	Insertion
	X	14905400..	Y70D2A.6	-	WBGene00197969	ncRNA	Insertion

Genom	Chro- mo- som	Position im Genom	Sequenz	Gen	Wormbase ID	Beschrei- bung	Mutation
<b>dus58</b>		14905614					
	X	11917005.. 11920158	Y62H9A.13	-	WBGene00013401	Protein kodierend	Austausch
	X	14674328.. 14683326	F40E10.4	<i>sIt-1</i>	WBGene00004854	Protein kodierend	Austausch
<b>dus60</b>	I	4457383.. 4469461	C41D11.11	<i>eri-6</i>	WBGene00016561	Intron	Insertion
	I	6104805.. 6105589	T27A3.8	-	WBGene00044611	Protein kodierend	Missense (Stop)
	IV	9523764.. 9524895	C33A12.1	-	WBGene00007880	Protein kodierend	Missense
	V	13646884.. 13648397	H37A05.4	-	WBGene00044200	-	Insertion
	V	15766507.. 15767571	F57A10.2	-	WBGene00010184	Protein kodierend	Missense (Stop)
	X	15748031.. 15748101	ZK678.t2	-	WBGene00014627	tRNA	Insertion
	X	2035943.. 2038220	Y102A11A. 7	-	WBGene00022417	Protein kodierend	Missense
	X	767023.. 768069	T04G9.5	<i>trap-2</i>	WBGene00020216	Protein kodierend	Silent
	X	16661043.. 16663194	F43B10.1	-	WBGene00018373	Protein kodierend	Silent
	X	6823890.. 6825862	F41B4.1	-	WBGene00018257	Protein kodierend	Missense
	X	6880909.. 6881571	F41C6.6	-	WBGene00018279	Protein kodierend	Missense
	MtD NA	6506.. 7808	MTCE.25	<i>nduo-4</i>	WBGene00010963	MTCE.25	Modifier
	MtD NA	11691.. 13272	MTCE.35	<i>nduo-5</i>	WBGene00010967	MTCE.35	Missense





## Danksagung

An erster Stelle geht mein Dank an Prof. Dr. Olaf Bossinger für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation. Zudem bedanke ich mich bei ihm für die Bereitstellung des Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und für seine Unterstützung, auch bei der Umsetzung neuer Ideen.

Prof Dr. Siegfried Roth danke ich für seine Gutachter-Tätigkeit und das Interesse an dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Michael Kroiher für die Übernahme des Zweitgutachtens. Zudem bin ich dankbar für die Verbundenheit zum Labor von Prof. Dr. Schierenberg und die ständige Hilfsbereitschaft der Mitarbeiter, insbesondere bei der Durchführung der 4-D-Mikroskopie. Ebenso möchte ich mich für die Überlassung der freilebenden Nematoden bedanken.

Der Bayer CropScience AG (Monheim), insbesondere Dr. Peter Lümmer, bin ich dankbar für die erfolgreiche Kooperation.

Darüber hinaus möchte ich sowohl bei Prof. Dr. Andreas Wodarz vom Institut I für Anatomie (AG Molekulare Zellbiologie) als auch bei Prof. Dr. Rudolf Leube vom Institut für Molekuläre und Zelluläre Anatomie der Uniklinik RWTH Aachen dafür bedanken, dass ich deren Institute für die Forschung im Rahmen meiner Dissertation nutzen durfte. Bei allen Mitarbeitern der Institute möchte ich mich für die gute Stimmung, die netten Gespräche und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei Christian Hoffmann und Ferdi Grawe bedanke ich mich für die kompetente Hilfe und Unterstützung sowie die Reise in das mir unbekannte Feld der Elektronenmikroskopie. Dabei geht mein Dank auch an Steffen Köhler für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Julia Camps für die umfangreiche Unterstützung während der Bearbeitung meiner Dissertation. In diesem Zusammenhang möchte ich Dr. Julia Camps und Lydia Lubowiecki für die tolle gemeinsame Zeit, vor allem im Hinblick

auf die gemeinschaftliche Arbeit zum Start dieses Projekts, danken. Dr. Manu Tiwari danke ich für die Unterstützung bei der bioinformatischen Auswertung sowie der Analyse meiner Daten. Weiterhin danke ich Dr. Philipp H. Schiffer für die Daten der Cluster-Analyse zum Sequenzvergleich der Succinat-Dehydrogenase-Proteine.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Kolleginnen Julia, Irina, Katja, Stephi sowie Jolanta für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen fruchtbaren, wissenschaftlichen Gespräche. Vielen Dank für die Unterstützung in hektischen Zeiten, die zur Entspannung beigetragen hat - Danke für Kaffee, Tee, Süßes und Freundschaft.

Abschließend möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Verwirklichung dieser Arbeit geholfen haben.



## Erklärung

Erklärung (entsprechend §4 Abs. 1 Nr. 9 der Promotionsordnung vom 02. Februar 2006, mit Änderungen vom 10. Mai 2012):

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof Dr. Siegfried Roth und Prof. Dr. Olaf Bossinger betreut worden.

Theresa Vogt